



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ESTUDIO PROTEÓMICO DE DEFECTOS EN LOS COMPLEJOS DE
LA CADENA RESPIRATORIA CAUSANTES DE
MITOCONDRIOPATÍAS: UN POSIBLE MÉTODO DIAGNÓSTICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DIANA LASHIDUA FERNÁNDEZ COTO

ASESORES:

Dr. JUAN FERNANDO MINAURO SANMIGUEL

M. en C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis**:

Estudio proteómico de defectos en los complejos de la cadena respiratoria causantes de
mitocondriopatías: un posible método diagnóstico

Que presenta la pasante: Diana Lashidua Fernández Coto

Con número de cuenta: 302796247 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 30 de junio de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Elia Granados Enriquez	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M.C. Ana Laura Vázquez Martínez	
1er SUPLENTE	Q.F.B. Luis Alberto Parra Oaxaca	
2do SUPLENTE	M.C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/nm



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar por supuesto agradezco a Dios, ya que me ha llenado de bendiciones, y ha dirigido mi camino para la culminación de este ciclo.

Esta tesis la dedico a mis padres: Guadalupe Coto y Felipe Fernández porque son mis dos pilares más grandes, por su apoyo, confianza, por su amor, sus sabios consejos, porque simplemente yo no habría hecho nada sin ustedes y sé que han sacrificado muchísimo por mí. Mis esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes, los amo. Agradezco a mi hermana Silvana por su apoyo y compañía que siempre me brinda, por las veces que no te dejé dormir por ayudarme en una tarea, porque nunca me dejaste caer y sabias las palabras exactas que me hacían sentir bien, en fin, porque sé que cuento contigo en todo.

A mi asesor principal: Dr. Fernando por su paciencia y motivación, por compartir sus conocimientos y por su disponibilidad hacia la realización de esta tesis.

A la Dra. Rosa María porque siempre estuvo pendiente de que no faltara nada en el laboratorio, despejo algunas dudas y por sus consejos.

Agradezco a mis abuelos Ger y Felisa, porque son los que siempre rezan por mí y me llenan de bendiciones, a toda la familia Fernández y a mis tías y primas “las Coto” por sus palabras y buenos deseos.

A mi novio Aldo, por haber estado siempre conmigo y haber compartido tantos buenos momentos, por dejarme ser parte de tu vida. Te amo.

A todos mis profesores no solo de la carrera sino de toda la vida, muchísimas gracias porque de alguna manera dejaron algo en mí para ser lo que ahora soy. Gracias profesora Ana Laura.



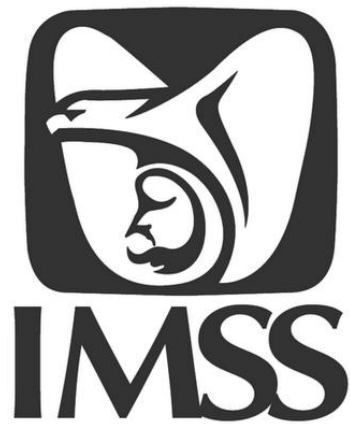
A todos mis amigos, espero poner a todos: a Gabriela Bravo, por todas las vivencias que compartimos juntas y por ser mi compañía durante toda la carrera, por tu amistad incondicional, a: Ana y Claudia: por este y todos los momentos de nuestras vidas que compartiremos juntas, a los que tuve la dicha de conocer en preparatoria: Alejandro (washan), Carlitos (pomu), Jesús (chucho), Cristian (willy), René (chuby), Ricardo (nervio), Nidia (nidito) y Diana (pachino), y a los que compartieron la carrera conmigo: Ivan, Gustavo, Xchel, Gabriela, Iris, Denisse, Diana, Angélica, Alan. Gracias por las risas, por todos los momentos, porque fueron parte de mi formación y han hecho tan divertida mi vida, por las aventuras, experiencias, por todo mil gracias.

A las niñas de la UIM en Genética: Carmen, Beatriz, Pilar, Conny. Por sus muy acertados consejos, su compañía y amistad.

Algunas personas miran al mundo y dicen ¿Por qué?. Otras miran al mundo y dicen ¿Por qué no? (*George Bernard Shaw*)

No existe mejor sueño que aquel que se sueña despierto. Y no existe mejor sensación que ver nuestros sueños hechos realidad. La vida es corta, invierte tu tiempo en atrapar esos sueños que habitan en tu corazón. (*Eric I. Franicevich*)

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Bajo la dirección del Dr. Juan Fernando Minauro Sanmiguel.





i. ÍNDICE GENERAL

i.	ÍNDICE GENERAL	i
ii.	Índice de figuras	iii
iii.	Índice de tablas.....	v
iv.	Abreviaturas	vi
v.	Resumen	viii
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	<i>Generalidades de la mitocondria</i>	1
1.2.	<i>DNA mitocondrial</i>	3
1.3.	<i>Enfermedades mitocondriales</i>	5
1.4.	<i>Fosforilación oxidativa</i>	8
1.5.	<i>Supercomplejos o respirosomas</i>	11
1.6.	<i>Análisis de los complejos de la OXPHOS por técnicas de proteómica</i>	14
1.6.1.	<i>Electroforesis nativa</i>	15
1.6.2.	<i>Electroforesis en 2D desnaturalizante</i>	17
1.6.3.	<i>Zimogramas</i>	19
1.6.4.	<i>Western blot</i>	20
2.	JUSTIFICACIÓN	22
3.	OBJETIVOS	24
3.1.	<i>Objetivo general:</i>	24
3.2.	<i>Objetivos específicos</i>	24
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
4.1.	<i>Material biológico</i>	25
4.2.	<i>Reactivos</i>	25
4.3.	<i>Métodos</i>	26
4.3.1.	<i>Obtención de mitocondrias por centrifugación diferencial</i>	27
4.3.2.	<i>Obtención de extractos crudos mitocondriales</i>	27
4.3.3.	<i>Solubilización</i>	28
4.4.	<i>Geles desnaturalizantes</i>	28





4.4.1.	<i>Geles nativos azules y claros en gradiente</i>	29
4.4.2.	<i>Doble dimensión desnaturalizante</i>	30
4.4.3.	<i>Western blot</i>	31
4.4.4.	<i>Zimogramas</i>	32
5.	RESULTADOS	33
5.1.	<i>Estandarización de las condiciones para un Western blot</i>	34
5.2.	<i>Estandarización de las condiciones de solubilización y gel nativo.</i>	35
5.3.	<i>Estandarización de condiciones para los zimogramas</i>	37
5.4.	<i>Separación y detección de complejos y supercomplejos por Western blot y zimogramas</i>	43
5.5.	<i>Electroforesis en dos dimensiones</i>	45
5.6.	<i>Identificación de complejos y supercomplejos por doble dimensión y Western Blot</i>	48
5.7.	<i>Estudio de un paciente con posible mitocondriopatía.</i>	50
6.	DISCUSIÓN	57
7.	CONCLUSIONES	62
8.	ANEXO	63
9.	REFERENCIAS	64





ii. Índice de figuras

Figura 1: La mitocondria	2
Figura 2: La mitocondria con un DNA propio que codifica varias subunidades de los complejos respiratorios	4
Figura 3: Esquema general de la maquinaria de la OXHPOS	8
Figura 4: Modelos que explican la distribución de los complejos en la membrana interna mitocondrial	12
Figura 5: Asociación entre los complejos I, IV y III para formar un supercomplejo estable	13
Figura 6: Dímero de la ATP asa visto por microscopia electrónica	14
Figura 7: Complejos mitocondriales separados por electroforesis nativa.....	17
Figura 8: A) Gel nativo azul de mitocondrias de corazón humano CI: a 1000kDa, CV: a 780kDa, CIII (dímero): a 600 kDa, CIV (monómero): a 250kDa. B) principio de la elaboración de una doble dimensión. C) resultado de un Western blot elaborado a una doble dimensión utilizando anticuerpos específicos para cada complejo.	18
Figura 9: Reacción colorimétrica del zimograma del complejo I	19
Figura 10: Reacción colorimétrica del zimograma del complejo IV	20
Figura 11: Subunidades mitocondriales	21
Figura 12: Diagrama general de la metodología seguida	26
Figura 13: Montaje para la preparación de geles en gradiente.	29
Figura 14: Realización de un gel en 2D.....	30
Figura 15: Diagrama general para la obtención de mitocondrias purificadas y extractos mitocondriales enriquecidos	33
Figura 16: a) Subunidades mitocondriales de extractos totales de ratón separadas por electroforesis desnaturalizante (12%). A) tinción con Comassie. B) subunidades de los complejos de la OXPHOS detectadas por WB de un extracto total mitocondrial	35
Figura 17: Curva de concentración de detergente.....	36
Figura 18: Curva de cantidad de proteínas	37





Figura 19: Ensayo catalítico del complejo I mitocondrial.....	38
Figura 20: Ensayo catalítico del complejo V mitocondrial	39
Figura 21: Ensayo catalítico del complejo IV mitocondrial	40
Figura 22: Ensayo catalítico de los complejos mitocondriales I y IV	41
Figura 23: Comparación de los ensayos catalíticos de los complejos I, IV y V	42
Figura 24: Complejos y supercomplejos de mitocondrias de ratón.....	43
Figura 25: Ensayo catalítico de los complejos I y IV	44
Figura 26: Subunidades mitocondriales separadas por electroforesis en 2D	46
Figura 27: Subunidades mitocondriales separadas por electroforesis en 2D	47
Figura 28: Subunidades mitocondriales de tejido humano sano.....	48
Figura 29: Subunidades mitocondriales de tejido de ratón solubilizado con LM	49
Figura 30: Complejos mitocondriales de tejido del paciente y control solubilizados con LM, separados por electroforesis nativa clara, detectados por zimogramas	50
Figura 31: Subunidades mitocondriales derivadas de tejidos (solubilizados con LM) de paciente con probable mitocondriopatía y control detectadas por Western Blot	51
Figura 32: Subunidades mitocondriales derivadas de tejidos (solubilizados con LM) de paciente con probable mitocondriopatía y control detectadas por Western blot	52
Figura 33: Subunidades mitocondriales de tejido humano solubilizado con LM detectadas por Western blot.....	53
Figura 34: Subunidades mitocondriales de tejido humano solubilizado con digitonina detectadas por Western Blot.....	55





iii. Índice de tablas

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS DE LA MITOCONDRIA.....	3
TABLA 2: CARACTERÍSTICAS DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES MÁS FRECUENTES.	7
TABLA 3: REACTIVOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD POR ZIMOGRAMAS.....	32
TABLA 4: ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES A UTILIZAR DE CADA ANTICUERPO PRIMARIO.....	34





iv. Abreviaturas

DNA mt	DNA mitocondrial
DNA n	DNA nuclear
ADP	Adenosín difosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA r	RNA ribosomal
RNA t	RNA de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
BNE	Electroforesis nativa azul (por sus siglas en inglés)
CI, CII, CIII, CIV, CV	Complejo I, II, III, IV, V
Co Q	Coenzima Q
COX	Citocromo oxidasa
DAB	Diaminobencidina
DDM	Dodecil maltósido
DIGE	Electroforesis diferencial en gel (por sus siglas en inglés)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DOC	Desoxicolato
DTT	Ditiotreitrol
EACA	Ácido 6- aminocaproico
EDTA	Etilén-diamino-tetra-acético
FAD	Flavin adenin dinucleótido
FP	Flavoproteína
HCl	Ácido clorhídrico
HP	Hidrofóbico
hr- CNE	Electroforesis nativa clara de alta resolución (por sus siglas en inglés)
HRP	Peroxidasa de rábano (por sus siglas en inglés)





IP	Proteína de hierro
LM	Lauríl maltosido
LOHN	Neuropatía óptica hereditaria de Leber (por sus siglas en inglés)
LS	Síndrome de Leigh (por sus siglas en inglés)
MELAS	Encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios cerebrovasculares. (por sus siglas en inglés)
MERF	Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (por sus siglas en inglés)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NARP	Debilidad neurogénica ataxia y retinitis pigmentosa (por sus siglas en inglés)
NBT	Nitro azul de tetrazolio (por sus siglas en inglés)
OXPHOS	Fosforilación oxidativa (por sus siglas en inglés)
PBS-T	Amortiguador de fosfatos con Tween
pH	Potencial de hidrógeno
PMS	p- metil sulfóxido
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDHA,B,C,D	Succinato deshidrogenasa subunidad A,B,C,D
SDS	Lauríl sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
TEA	Trietilamina
WB	Western blot





v. Resumen

Las mitocondrias son organelos esenciales, ya que producen la mayor parte de energía que requiere la célula a través del acoplamiento de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y la respiración para llevar a cabo la síntesis de adenosín trifosfato (ATP). Las mitocondrias poseen un sistema membranal doble, con una membrana externa y una membrana interna muy dinámica que puede plegarse para formar las crestas mitocondriales, lugar donde se encuentran los complejos de proteínas de la cadena respiratoria y en donde ocurre la OXPHOS y la síntesis de ATP. Este organelo es el único, además del núcleo, con un DNA propio, circular de doble cadena, con genes que codifican solo para proteínas mitocondriales que se ensamblan en los complejos de la cadena respiratoria y para RNA de transferencia (RNA t) y ribosomal RNA r involucrados en la traducción y síntesis de esas proteínas. Las demás proteínas mitocondriales están codificadas en el núcleo. Cualquier mutación o cambio en estos genes que afecten específicamente la función de la OXPHOS dan lugar a patologías llamadas mitocondriopatías.

A pesar de que se conocen todos los genes que codifican las proteínas de la cadena respiratoria contenidos en el DNA mitocondrial (DNA mt) y que se han identificado mutaciones relacionadas con las mitocondriopatías, existe poca información a nivel funcional y/o estructural de lo que ocurre con los complejos de la cadena respiratoria. Durante mucho tiempo se pensó que estos complejos funcionaban de manera individual, sin embargo recientemente, se encontró que la mayoría están asociados entre sí formando complejos más grandes o supercomplejos conocidos como respirosomas. En el presente proyecto se probaron diferentes técnicas tales como: la electroforesis nativa azul (BNE), la electroforesis nativa clara de alta resolución (hr-CNE), zimografía y Western blot (WB), útiles en el análisis y estudio de los complejos respiratorios a nivel funcional y estructural.

Se lograron estandarizar las condiciones de cada técnica utilizando músculo de ratón y posteriormente se aplicaron al estudio de pacientes con posible mitocondriopatía. Los resultados mostraron que estas técnicas podrían utilizarse en el diagnóstico de las patologías estudiadas, ya que fue posible analizar la función y estructura de los complejos respiratorios en muestras biológicas, sin embargo es necesario continuar con el estudio mejorando algunas condiciones y utilizando un mayor número de pacientes.





1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de la mitocondria

La mitocondria es un organelo esencial en todas las células eucariontes, ya que, es la encargada de producir la mayor parte de energía necesaria para la célula en forma de ATP a través de la OXPHOS, manteniendo así la viabilidad celular (Hatefi, 1985). Además de la OXPHOS, las mitocondrias cumplen con otras tareas metabólicas, controlan la concentración de calcio citosólico, (Pozzan et al, 2000) y regulan la muerte por apoptosis de las células. También son la fuente principal de especies reactivas de oxígeno y guían otras vías bioquímicas importantes, incluyendo el ciclo de Krebs y el ciclo de la urea. (Wallace 1999; Chan 2006). Es el único organelo que contiene su propio DNA. (Anderson et al, 1981)

La mitocondria está constituida por un sistema membranal doble con membranas bien definidas, denominadas interna y externa; la externa delimita al organelo y permite la difusión de sustancias de hasta 10kDa; la interna es muy dinámica y forma múltiples invaginaciones llamadas crestas (*figura 1*), las cuales varían en cantidad dependiendo del tejido y situación metabólica, de tal forma que tejidos como el corazón, músculos, sistema nervioso, etc., contienen un mayor número de crestas mitocondriales pues su demanda energética es mayor. En estas crestas se alojan la mayoría de los complejos respiratorios, los cuales acoplados unos con otros y bien sincronizados se encargan de llevar a cabo la OXPHOS, por lo tanto es el lugar donde ocurre la síntesis de ATP (Gilkerson et al, 2003).

La disposición de las membranas, genera dos espacios al interior de la mitocondria, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (*figura 1*). El primero está delimitado por las dos membranas (doble bicapa lipídica) y es donde ocurre acumulación de protones (H^+) que se forman por la función de la OXPHOS (Anderson et al, 1981).





El espacio más interno se denomina matriz mitocondrial y está delimitado exclusivamente por la membrana interna, es de carácter gelatinoso, formado casi por un 50% de agua, contiene una elevada concentración de enzimas solubles para el metabolismo así como sustratos, cofactores e iones inorgánicos, además de contener la maquinaria genética. (figura 2).

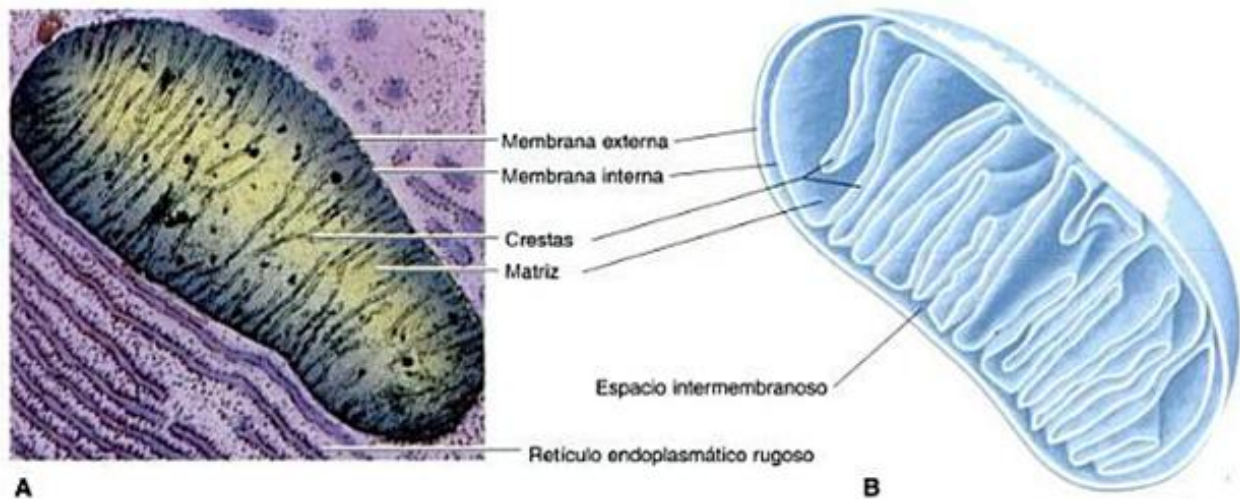


Figura 1: La mitocondria A) microfotografía electrónica de una mitocondria animal. B) diagrama de un corte de una mitocondria.

Las mitocondrias son poliploides, ya que, cada célula humana contiene cientos de mitocondrias, cada una de las cuales contiene 2-10 moléculas de DNA mt, lo cual puede ser relevante en varias patologías como la mitocondriopatías, esta y otras características particulares se resumen en la tabla 1

**Tabla 1: Características de la mitocondria**

Características de la mitocondria
➤ Herencia materna: Un ovocito aporta la inmensa mayoría de mitocondrias en la fecundación, la participación en el genotipo de la descendencia del DNA mt paterno no es apreciable. ➤ Tasa de mutación del DNA mt es 10 – 20 veces mayor que la del DNA n ➤ Segregación mitótica: Durante la división celular existe una distribución al azar de las mitocondrias entre las células hijas. ➤ Efecto umbral en el fenotipo: En la heteroplasmia existe un número determinado de mutantes que pueden no modificar el fenotipo, rebasando un efecto umbral el fenotipo se ve afectado cuando no hay una complementación entre las células mutadas y las no mutadas. ➤ Poliplasmia: En cada célula hay cientos o miles de mitocondrias

1.2. DNA mitocondrial

El DNA mt, se halla empaquetado en una molécula circular de doble cadena de 16 569 pares de bases (16.5kb) (Anderson et al, 1981), está completamente secuenciado y se conoce que contiene información para 37 genes que codifican para: 2 tipos de ácido ribonucleico ribosomal (RNA r), 22 RNA de transferencia (RNA t) y 13 polipéptidos que son subunidades de enzimas de los complejos de la fosforilación oxidativa (7 subunidades del complejo I, 1 del complejo III, 3 del complejo IV y 2 del complejo V) (*figura 2*). El complejo II es codificado completamente por el DNA n. (Pakendorf & Stoneking 2005; Wallace 1999; Wallace 2005)



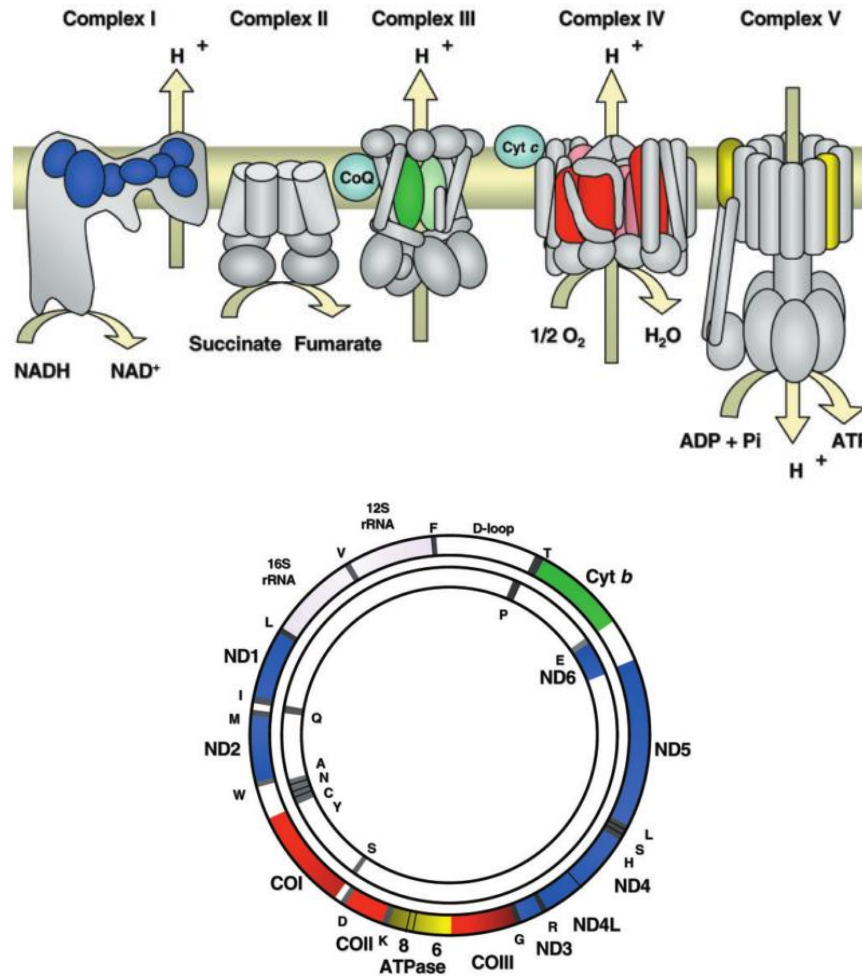


Figura 2: La mitocondria con un DNA propio que codifica varias subunidades de los complejos respiratorios I (azul), III (verde), IV (rojo), y V (amarillo).

Todas las secuencias codificantes son contiguas unas de otras sin intrones entre sí, el único tramo no codificante del DNA mt es una región denominada asa-D, una región de aproximadamente 1kb, que contiene los promotores para la transcripción de la cadena ligera y la cadena pesada (*figura 2*). (Zeviani Di Donato 2004)

La tasa de mutación de este DNA mt es mayor que la del nuclear ya que como se mencionó, es en la mitocondria donde se producen especies reactivas de oxígeno que dañan este DNA, además existen sistemas de reparación pero no son específicos, estas mutaciones pueden llevar al origen de mitocondriopatías.





1.3. *Enfermedades mitocondriales*

Por convención, el término “enfermedades mitocondriales” se refiere a los trastornos de la cadena respiratoria mitocondrial, la cual es la única vía metabólica de la célula que se encuentra bajo el control dual del genoma mitocondrial y el genoma nuclear. Por lo tanto una clasificación genética de las enfermedades mitocondriales distingue desordenes debidos a mutaciones en el DNA mt, que se rigen por las reglas relativamente laxas de la genética mitocondrial y desordenes debidos a mutaciones en el DNA n, que se encuentran regidos por las estrictas reglas de la genética mendeliana (Di Mauro 2004). Las alteraciones mitocondriales se describieron en la década de 1960 en las denominadas miopatías mitocondriales, cuando los estudios sistemáticos e histoquímicos revelaron una excesiva proliferación de mitocondrias en músculo de pacientes con intolerancia al ejercicio, mediante la tinción con la técnica tricrómica de Gomori, en la que las áreas con una acumulación mitocondrial se observaban púrpuras, las fibras anormales fueron denominadas “fibras rojas rasgadas”, llegando a ser consideradas un sello patológico de la enfermedad mitocondrial. Sin embargo, pronto se hizo evidente que en muchos pacientes con estas fibras, la miopatía estaba asociada con síntomas y signos de afectación cerebral, y el término de “encefalopatía mitocondrial” fue introducido (Engel & Cunningham 1963). También quedó claro que la falta de estas fibras en la biopsia no excluye una etiología mitocondrial (Cao et al, 2001), como se ejemplifica por el síndrome de Leigh (LS), una encefalopatía de la infancia o la niñez, debida a la disfunción mitocondrial, pero que casi nunca está acompañada de las “fibras rasgadas”.

En los años ochenta hubo un gran avance en el campo de las encefalomiopatías mitocondriales. Con ayuda de datos bioquímicos descubiertos en esa década se formuló la primera clasificación bioquímica (DiMauro et al, 1987).

Las manifestaciones clínicas de estas enfermedades son muy variadas (*tabla 2*) y entre las más comunes encontramos: demencia, ptosis, trastornos motores, intolerancia al ejercicio, accidentes cerebrovasculares, cardiomiopatía, convulsiones, retinopatía pigmentaria, atrofia óptica, ceguera, sordera, hepatitis, etc.





Son trastornos multisistémicos que afectan a los tejidos y órganos que mas dependen de la energía mitocondrial; músculo esquelético y cardiaco, órganos como corazón, hígado, riñones, retina, médula ósea, nervios periféricos y páncreas.

Las enormes diferencias en el fenotipo clínico hacen a estos trastornos mitocondriales difíciles de identificar y caracterizar. Sin embargo con una incidencia de 1 en 5000 personas se conocen como el grupo más común de errores innatos del metabolismo. (Thorburn et al, 2004). Cuando un paciente es clínicamente diagnosticado, se llevan a cabo análisis enzimáticos especializados para encontrar posibles deficiencias de los complejos de la OXPHOS, pudiendo resultar deficiencia de solo uno de los complejos o un defecto de más enzimas a la vez. El siguiente paso es identificar el gen afectado, lo cual es muy complicado ya que aunque una sola enzima sea la afectada, numerosos genes pueden participar en la deficiencia y deben ser secuenciados. Por esta razón representan un reto para los médicos y deben ser tratadas por equipos multidisciplinarios. (Tamara & González 2004)

El hecho de que los complejos de la cadena respiratoria se codifiquen a partir de dos genomas tiene varias implicaciones, el genotipo mitocondrial de un individuo debería estar compuesto de una especie única de DNA mt, condición conocida como homoplasmia, sin embargo, la tendencia intrínseca del DNA mt de mutar puede determinar una condición conocida como heteroplasmia, donde el tipo nativo y los genomas mutados coexisten dentro de la célula. En el caso de heteroplasmia, durante la mitosis las dos clases de DNA mt son distribuidas a las células hijas y las mutaciones pueden ser acumulativas. Este fenómeno es importante en mutantes que producen defectos que derivan en enfermedades como las mitocondriopatías, donde frecuentemente se observa un efecto umbral dado por el nivel de mitocondrias mutadas y aumenta notablemente la variabilidad fenotípica de las enfermedades mitocondriales. (Zeviani & Di Donato 2004)

Durante mucho tiempo se han buscado mutaciones relacionadas con mitocondriopatías, de hecho muchas de ellas correlacionan con la pérdida de actividad o disminución del complejo afectado, sin embargo el efecto a nivel estructural y de supercomplejos no ha sido muy estudiado.

La disminución o defecto en la actividad de alguno de los complejos de la OXPHOS pueden afectar su funcionamiento, afectando su ensamblaje o el de los supercomplejos (D'Aurelio et al, 2006), de hecho la evidencia apunta a que el número de estos supercomplejos puede estar involucrado con el efecto umbral de las mitocondriopatías (D'Aurelio et al 2006).





Para hacer este tipo de análisis se tiene un interés particular en las técnicas de proteómica como herramientas útiles en el diagnóstico y estudio de estas patologías, logrando un gran avance en el estudio y caracterización de estas enfermedades.

Tabla 2: Características de las enfermedades mitocondriales más frecuentes.

Enfermedad	Características clínicas	Complejo defectuoso
MELAS	Focos de Lesiones cerebrales, acidosis láctica, signos de afectación del SNC incluyen la demencia, vómitos, dolor de cabeza, convulsiones, sordera, ataxia en algunos pacientes, miocardiopatía, etc.	Complejo I y IV (Chomyn 1992; King 1992)
NARP	Afecta a personas jóvenes causando ataxia, retinitis pigmentosa, demencia, ataques y neuropatía sensorial	Complejo V
LHON	Pérdida de visión aguda o subaguda en personas jóvenes, más frecuentemente en varones, debido a una atrofia óptica bilateral	Complejo I
Leigh	Encefalopatía de la infancia o la niñez caracterizada histológicamente por zonas simétricas de necrosis que afectan el cerebro medio, ganglios basales, tálamo y nervios ópticos presentando; síndrome piramidal, ataxia, oftalmoplejia, distonia, temblor atrofia óptica, dificultad respiratoria, etc	Complejo I, II, IV, V
MERF	zonas simétricas de necrosis que afectan el cerebro medio, ganglios basales, tálamo y nervios ópticos presentando; síndrome piramidal, ataxia, oftalmoplejia, distonia, temblor atrofia óptica, dificultad respiratoria, etc	Complejo IV



1.4. Fosforilación oxidativa

La maquinaria de la OXPHOS, está compuesta por más de 80 polipéptidos diferentes, organizados en cinco complejos membranales y dos moléculas móviles que los unen; la ubiquinona y el citocromo c (figura 3). Estos complejos conforman la cadena de transporte de electrones.

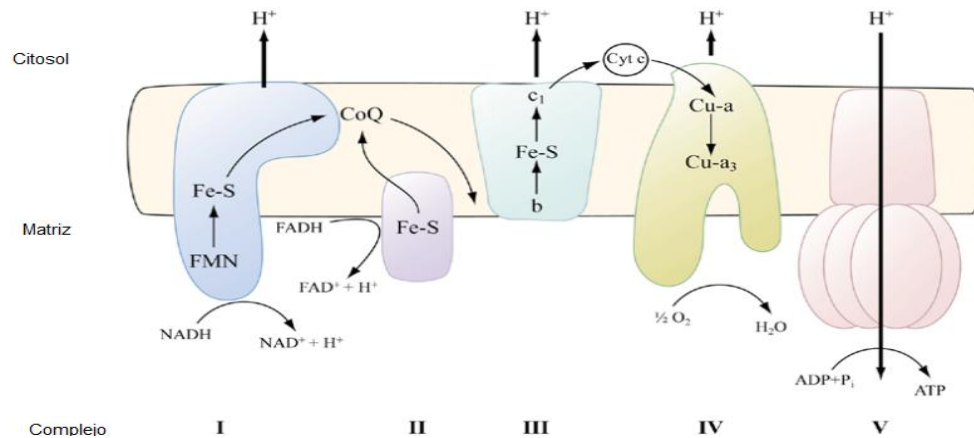


Figura 3: Esquema general de la maquinaria de la OXPHOS. (Shoubridge E, 2001)

Complejo I (NADH - ubiquinona oxidorreductasa): es el sitio de inicio de la cadena y la principal entrada de electrones, compuesto de 43 subunidades, siete codificadas en el DNA mt (Carroll et al, 2003) El complejo se disocia en un brazo periférico soluble conteniendo la flavoproteína (FP) y la proteína de hierro (IP), y un brazo hidrofóbico (HP) incrustados en la membrana mitocondrial interna. Todas las subunidades codificadas en el DNA mt y al menos 24 de las codificadas en el nuclear están ubicadas en la fracción HP. (Shoubridge 2001)

La fracción FP traspasa dos electrones desde el NADH y se reduce, tomando para ello un protón de la matriz, los electrones de la fracción FP reducida pasan a la fracción IP, que los transporta de uno en uno quedando los protones libres que pasan al espacio intermembrana. Los electrones salen del complejo I hasta la ubiquinona capaz de transportar dos protones y dos electrones, el paso de los electrones por el complejo provoca un bombeo de protones desde el interior de la mitocondria, la ubiquinona toma dos protones del medio y se reduce a ubiquinol, y cede los electrones al complejo III.



Complejo II (succinato - ubiquinona oxidoreductasa): este complejo es el único complejo codificado completamente por el DNA n, está compuesto por dos proteínas solubles, la subunidad FP (SDHA) y la IP (SDHB), las cuales se encuentran anclados del lado de la matriz en la membrana interna por dos subunidades de membrana [cybS (SDHC) y cybL (SDHD)]. Las proteínas solubles contienen la actividad de succinato deshidrogenasa, las subunidades asociadas a la membrana contienen al citocromo b y los sitios de unión a la ubiquinona, y son responsables de la transferencia de electrones (Shoubridge 2001).

Los electrones que cede el FAD a la cadena, provienen del ciclo de Krebs a partir del succinato, que se encuentra en la matriz mitocondrial. Este succinato da lugar al fumarato mediante la pérdida de dos protones que recoge el FAD dando lugar al FADH_2 . Los electrones pasan a una agrupación Fe-S del citocromo b y de ahí a la ubiquinona. De aquí en adelante el proceso es el mismo que cuando el NADH cede los electrones. El complejo II no transporta protones a través de la membrana mitocondrial.

Complejo III (citocromo c reductasa): compuesto por 11 subunidades polipeptídicas, todas excepto el citocromo b son codificadas por el DNA n. Este complejo cataliza la transferencia de electrones desde la ubiquinona al citocromo c.

El citocromo b contiene un grupo hemo con un átomo de hierro, que pasa de Fe^{3+} a Fe^{2+} , cede los electrones a una agrupación Fe-S y queda de nuevo en estado oxidado, esta agrupación cede el electrón al citocromo c_1 que lo pasa al citocromo c fuera del complejo, y finalmente pasa al complejo IV.

Complejo IV (citocromo c oxidasa COX): Es la enzima terminal en la cadena respiratoria mitocondrial, cataliza la reducción del oxígeno molecular por el citocromo c reducido. Está compuesto por 13 subunidades, de las cuales 10 son codificadas por genes nucleares. Dos de las subunidades nucleares (VIa y VIIa), tienen isoformas tejido específico. Las tres subunidades codificadas por el DNA mt (COI-III) forman el núcleo catalítico de la enzima.





Los electrones son cedidos del citocromo c a un átomo de cobre presente en el complejo IV, de aquí pasan al citocromo a, a otro átomo de cobre y finalmente al citocromo a_3 que se los cede al oxígeno el cual se reduce y forma agua. El complejo IV actúa como una bomba de protones que funciona gracias a la energía obtenida por las reacciones redox.

Complejo V (ATP-sintasa): está compuesto por 16 subunidades. Las subunidades A y A6L son codificadas por los genes ATP 6 y 8 del DNA mt respectivamente, el resto están codificadas en el núcleo. Está formado por el segmento F_0 que atraviesa a la membrana, responsable de la translocación de protones, y el segmento F_1 que se extiende en la matriz y contiene el centro catalítico.

El segmento F_0 funciona como un poro de protones, transfiriendo la energía liberada por el flujo de protones hacia la subunidad catalítica F_1 , por un mecanismo tipo motor, para formar ATP.

Los complejos I, III, IV participan en la oxidación de NADH, produce tres ATPs por cada NADH mientras que la oxidación del $FADH_2$, en la que participan los complejos II, III y IV, produce solo dos ATPs por cada $FADH_2$ oxidado. Los electrones resultado de la oxidación de grasas y carbohidratos son trasladados al oxígeno a lo largo de los primeros cuatro complejos de la cadena respiratoria (CI-CIV), produciendo agua y proporcionando la energía necesaria para bombear protones a través de la membrana interna desde la matriz hasta el espacio intermembrana donde se acumulan y forman un gradiente electroquímico que permite al quinto complejo (ATP sintasa), fosforilar el ADP formando así ATP (*figura 3*) (Sharma *et al*, 2009).

Durante mucho tiempo se creyó que estos complejos actuaban de manera individual sin embargo durante las últimas décadas se demostró que estos complejos pueden actuar de forma conjunta e interactúan formando asociaciones llamadas supercomplejos o respirosomas. (Schägger 2002; Schägger & Pfeiffer 2000)





1.5. *Supercomplejos o respirosomas*

Como ya se mencionó, una de las interrogantes sobre las que se ha investigado mucho es la del arreglo y función de los complejos de la cadena respiratoria. Existían principalmente dos modelos para explicar la organización estructural de estos complejos (*figura 4*); estos modelos oscilan entre dos extremos, uno es el modelo del “estado sólido” con los complejos respiratorios I-IV formando asociaciones entre ellos y un modelo del “estado líquido” también conocido como modelo de colisiones al azar de Hackenbrock, que prevee la difusión lateral de los complejos individuales en la membrana e independientemente uno del otro (Hackenbrock et al, 1986). El modelo del estado sólido fue apoyado inicialmente por el aislamiento o reconstitución estequiométrica de dos o más complejos y algunos análisis de cinética, posteriormente fracasó debido a que ni por microscopia electrónica ni por fusión liposomal se encontraban asociaciones entre los complejos. Por otro lado en el modelo del estado líquido la evidencia mostraba que los complejos aislados conservaban su actividad, sin la necesidad aparente de otras asociaciones. (Wittig & Schägger 2009) La asociación directa de los complejos respiratorios no parecía necesaria para el flujo de electrones efectivo, por lo que el modelo del estado líquido fue poco a poco aceptado.

Sin embargo, durante la última década varias líneas adicionales de pruebas demostraron que los complejos individuales se ensamblan en supercomplejos, apoyando el modelo del estado sólido; el aislamiento de supercomplejos estables de los complejos respiratorios III y IV de ciertas bacterias; la visualización por microscopia electrónica, así como el análisis de control de flujo en las mitocondrias de corazón de bovino dió pruebas cinéticas de la asociación entre los complejos I y III.



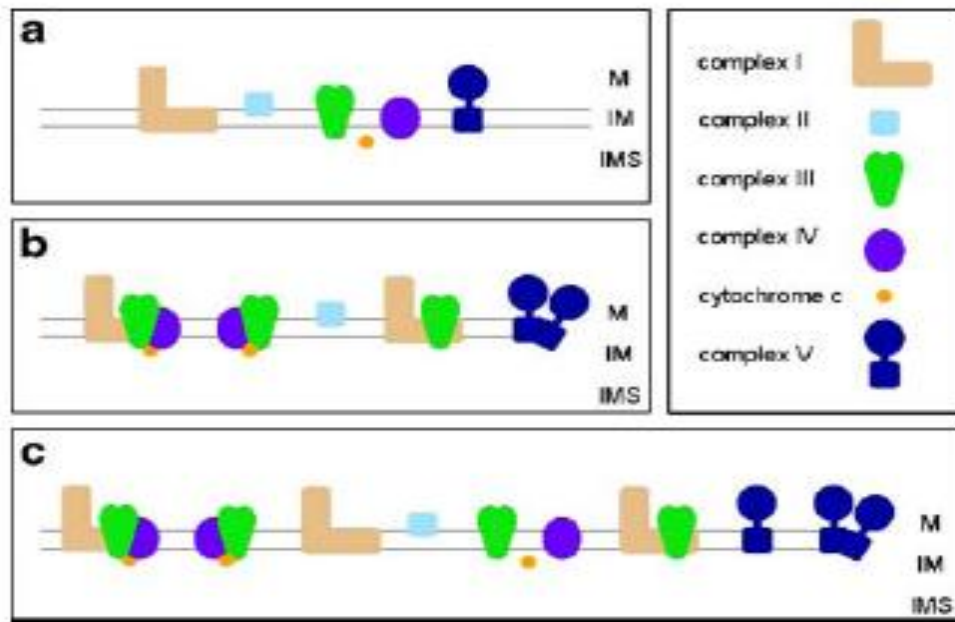


Figura 4: Modelos que explican la distribución de los complejos en la membrana interna mitocondrial.

a) modelo del estado líquido, b) modelo del estado sólido, c) integración entre ambos modelos.

Los supercomplejos se pueden aislar de la membrana si se utiliza un detergente neutro como la digitonina para su solubilización (Schägger & Pfeiffer 2000; Schägger 2002; Eubel et al, 2003; Schäfer et al, 2006). Uno de los métodos para caracterizar bioquímicamente a los supercomplejos son las técnicas electroforéticas de BNE y hr-CNE, de hecho la primera fue como se logró visualizar por vez primera estos complejos. Los primeros supercomplejos caracterizados bioquímicamente fueron dos supercomplejos de *Sacharomices cerevisiae*, un dímero del complejo III y una o dos copias del complejo IV (Cruciat et al, 2000), y diferentes supercomplejos de bovino con un complejo I, un dímero del complejo III y más de cuatro copias del complejo IV. (Schägger & Pfeiffer 2000)

Gracias a estos estudios han sido detectadas diferentes estequiometrias de algunos supercomplejos, tales como; el complejo monomérico I (I_1) con el complejo dimérico III (III_2), y el complejo IV en diferente número de copias (IV_x). (figura 5). Sin embargo estas estequiometrias pueden variar de especie a especie.

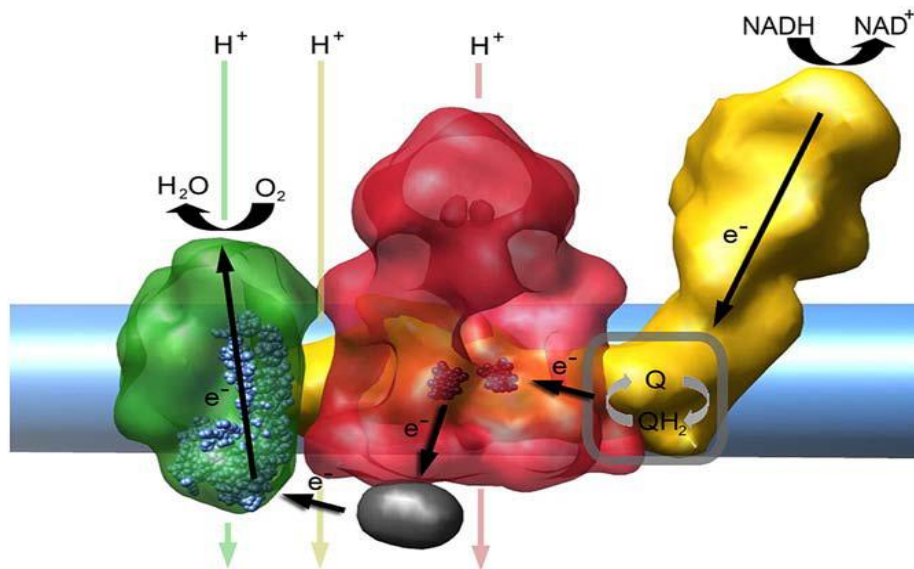


Figura 5: Asociación entre los complejos I, IV y III para formar un supercomplejo estable. (Janet 2009)

El papel funcional de los supercomplejos respiratorios no está completamente determinado, se propone que contribuyen a la mejora catalítica para la canalización de sustratos (Schägger 2001; Lenaz & Génova 2007), la estabilización de los complejos mitocondriales mediante su asociación en supercomplejos (Acin et al, 2004; Díaz *et al*, 2006) y el secuestro de intermediarios reactivos. Algunas de estas propuestas se han verificado experimentalmente: por ejemplo, se demostró la estabilización del complejo I por la formación de un supercomplejo en una bacteria, en células humanas y en biopsias de músculo esquelético de pacientes con enfermedades mitocondriales (Schägger & Pfeiffer 2001). La canalización de sustratos de electrones entre el complejo I y III ha sido verificada mediante estudios de control de flujo. En el caso de la ATP sintasa gracias a la microscopía electrónica se sabe que se encuentra formando dímeros y que estos cumplen un papel estructural ya que son responsables de la formación de crestas mitocondriales (Allen 1995). Además de esta evidencia varios supercomplejos mas han sido visualizados por microscopía electrónica (Minauro-Sanmiguel et al, 2005; Dudkina et al, 2006) (*figura 6*) y están presentes en diferentes tipos biológicos como ratones, humano, levaduras, plantas, etc.



Actualmente, tomando en cuenta que también existen complejos aislados en condiciones nativas, el modelo que se propone es una integración de los modelos anteriores, de tal forma que los complejos y supercomplejos pueden existir simultáneamente, lo cual podría obedecer a la dinámica mitocondrial y la manera en que se comporta la membrana interna y las crestas mitocondriales.

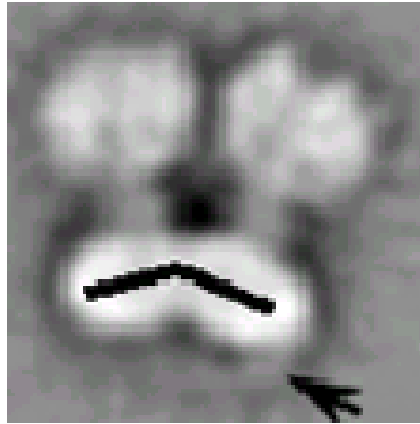


Figura 6: Dímero de la ATP asa visto por microscopia electrónica (Minauro Sanmiguel 2006), muestra una asociación angulada que probablemente tiene que ver con la biogénesis de las crestas mitocondriales.

1.6. Análisis de los complejos de la OXPHOS por técnicas de proteómica.

El término proteoma describe al conjunto de proteínas de un genoma y al estudio de estas proteínas se le denomina proteómica. La proteómica es una disciplina que consta de numerosas técnicas útiles en el análisis y estudio de las proteínas.

La electroforesis en 2D surgió en los años setenta como una herramienta útil y muy utilizada en el estudio de las proteínas y en los años noventa la espectrometría de masas surge como un método analítico muy poderoso, la combinación de ambas técnicas permite un análisis completo que permite profundizar en el papel de las proteínas en diferentes contextos. Este desarrollo, junto con la disponibilidad de los genomas secuenciados marcó el comienzo de una nueva era en la investigación biológica.





Actualmente muchas áreas de estudio han sido agrupadas dentro de la proteómica. Se pueden incluir, entre otros, los estudios de interacciones de proteínas, de modificaciones pos-traduccionales, el análisis funcional de las proteínas y estudios de localización. Como es el caso del estudio de los complejos de la OXPHOS en el que se utilizan técnicas nuevas que permiten identificar interacciones entre proteínas, cuantificar actividad y cantidad de estas, para después relacionar estos resultados con las patologías estudiadas.

1.6.1. Electroforesis nativa

Como ya se mencionó, los cinco complejos de la cadena de transporte de electrones constan de múltiples subunidades. La separación por electroforesis de estos complejos en forma nativa es una tarea difícil debido a diferentes razones, en primer lugar, el hecho de que son proteínas integrales de membrana, con segmentos muy hidrofóbicos y por lo tanto requieren la adición de un detergente para mantenerlos en solución. En segundo lugar, ya que son complejos de múltiples subunidades existe el riesgo de la disociación parcial durante el proceso de electroforesis. En tercer lugar los complejos se organizan en estructuras de orden superior o supercomplejos. (Schägger & Pfeiffer 2000)

Shagger y Von Jagow desarrollaron la electroforesis nativa azul (BNE), que permite aislar a los complejos en su forma nativa, como estrategia para enfrentar estos problemas (Schägger & Pfeiffer 2000). Esta técnica fue desarrollada para la separación de proteínas de la membrana mitocondrial y complejos que pesen de 10kDa a 10MDa (Schagger et al, 1994). El fundamento de la electroforesis nativa azul se basa en la utilización de detergentes no iónicos para solubilizar los complejos membranales, los más utilizados son: la digitonina, capaz de separar asociaciones supramoleculares de complejos multiprotéicos (respirosomas), y el lauril maltósido (LM o DDM) que es un detergente útil para separar proteínas de membrana y complejos individuales (*figura 7*).





Seguida de esta solubilización el colorante aniónico azul de Comassie G-250 es agregado, gracias a las propiedades hidrofóbicas de este colorante logra unirse a las proteínas de membrana. El enlace de un gran número de moléculas del colorante provoca un cambio de carga en las proteínas, el cual provoca que incluso las proteínas básicas migren hacia el ánodo a un pH de 7.5. Sin embargo, las proteínas no son separadas de acuerdo con la relación masa/carga, pero sí según al tamaño, ya que en los geles de acrilamida en gradiente la migración de las proteínas se desacelera gradualmente con la distancia recorrida y con la disminución del tamaño del poro del polímero de acrilamida. Las proteínas individuales deben detenerse casi completamente cuando su tamaño es igual al tamaño del poro. (Wittig et al, 2006)

Ya que la carga negativa de la superficie de la proteína hace que se repelan unas a otras, la tendencia de las proteínas de membrana a agregarse es considerablemente reducida con esta técnica. Por otra parte, la superficie de la membrana pierde su carácter hidrofóbico al enlazarse al colorante, lo cual convierte a las proteínas en proteínas solubles en agua. Esto significa que no es necesario utilizar algún detergente en la BNE una vez que el Comassie ha ocupado la superficie de la proteína. Por lo tanto el riesgo de la desnaturalización de las proteínas sensibles al detergente se minimiza durante la electroforesis nativa. (Wittig et al, 2006)

Sin embargo la interacción con el Comassie puede interferir con la medición de actividad y otras técnicas como la detección de fluorescencia. En este caso, existe una alternativa también diseñada por Shägger y Von Jagow que se conoce como electroforesis nativa clara de alta resolución (hrCNE) en la que se evitan las interferencias del colorante, aunque su poder de resolución es menor que el de la BNE. (Wittig & Schagger 2005)

La hrCNE es útil en la realización de la medición de actividad enzimática (zimogramas) ya que, no tiene la interferencia de color con el colorante Comassie..





Esta técnica utiliza una mezcla de detergentes en el amortiguador de cátodo, uno neutro (DDM) y uno aniónico, el desoxicolato (DOC), que cumplen la función del azul de Coomassie en la BNE, estos detergentes permiten la formación de micelas mixtas que colocan cargas negativas en la superficie de la proteína y así permiten su separación también por tamaños. (Wittig et al, 2007)

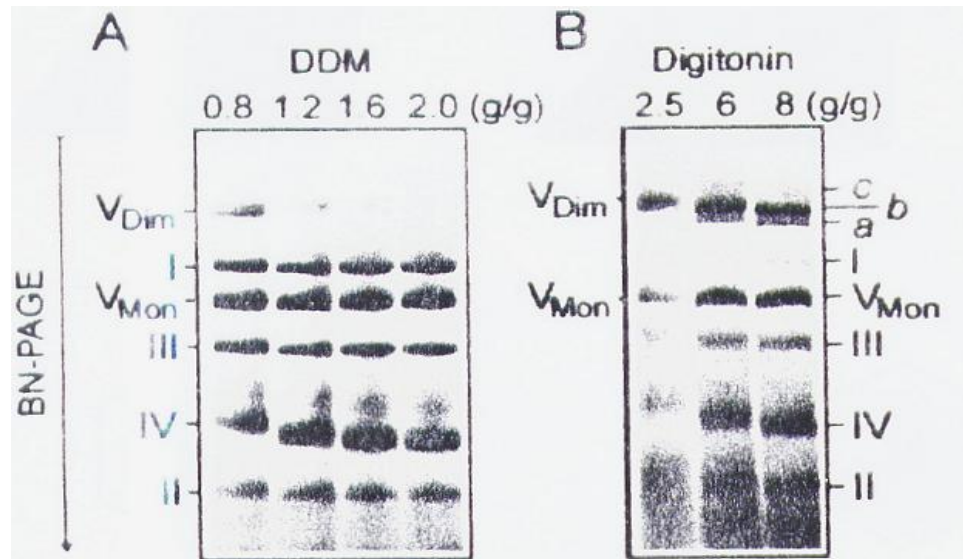


Figura 7: Complejos mitocondriales separados por electroforesis nativa y solubilizados con: A) duodecil maltósido (DDM) B) digitonina (Schagger 2002)

1.6.2. Electroforesis en 2D desnaturalizante

La electroforesis nativa separa complejos y supercomplejos de acuerdo a su tamaño y forma en una primera dimensión, donde la estructura y función de los mismos se conserva. Estos complejos pueden separarse en una doble dimensión subsecuente, generalmente una electroforesis desnaturalizante o incluso otra nativa que, se hace con el fin de resolver la composición de los complejos y supercomplejos por su separación. De esta manera el contenido y la distribución de las subunidades individuales pueden ser mostrados, permitiendo la identificación de las interacciones presentes en el supercomplejo y la detección de posibles subensamblajes (figura 8). Tales subensamblajes pueden en algunos casos ser indicativos de la presencia de un defecto en un gen específico.



Otra manera en que se puede identificar la composición de un supercomplejo es por una segunda dimensión nativa. En este caso se debe aprovechar la diferencia de solubilización entre los detergentes; el detergente utilizado en la primera dimensión nativa debe respetar las asociaciones que mantienen a los supercomplejos y, en la segunda, el detergente debe separar solo a los supercomplejos, esto permite identificar a los supercomplejos y las posibles proteínas que participan en la asociación.

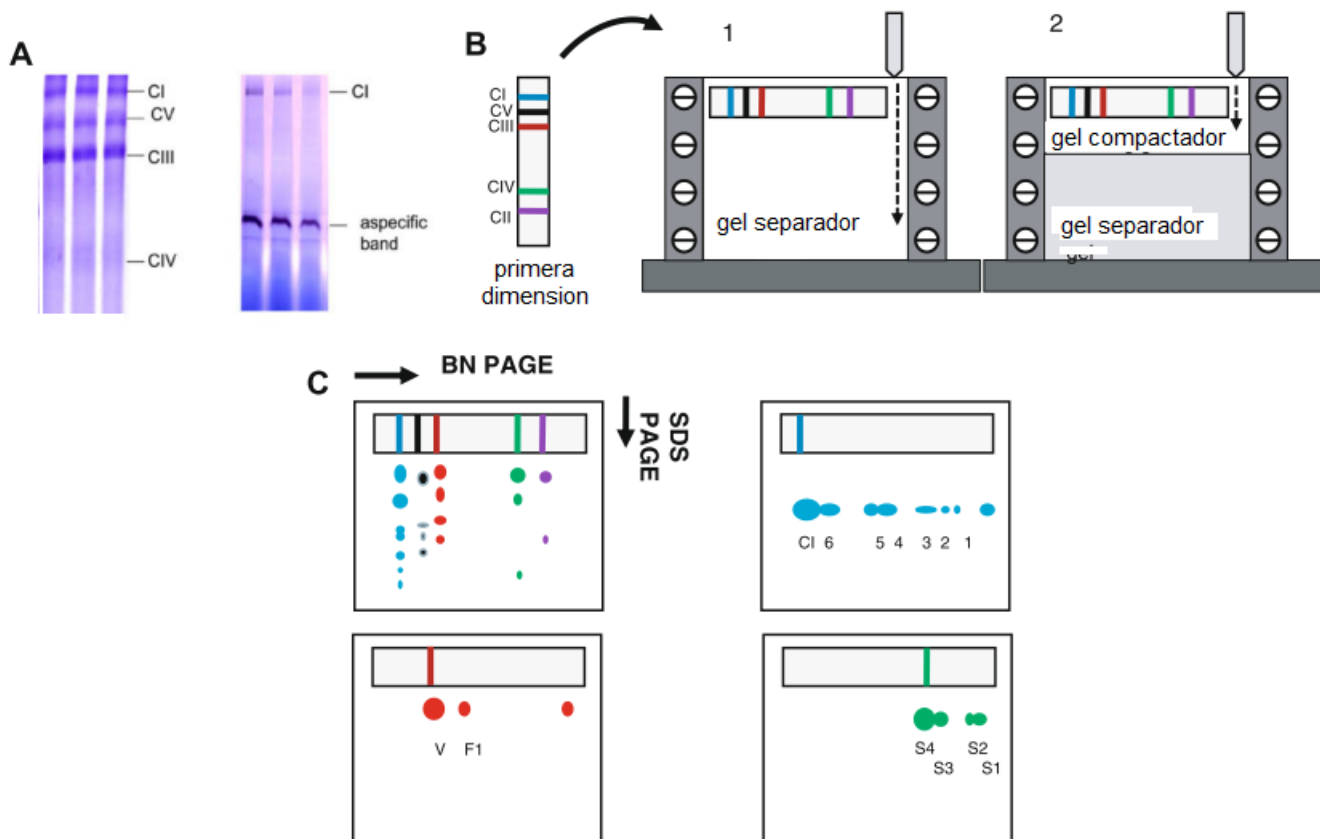


Figura 8: A) Gel nativo azul de mitocondrias de corazón humano CI: a 1000kDa, CV: a 780kDa, CIII (dímero): a 600 kDa, CIV (monómero): a 250kDa. B) principio de la elaboración de una doble dimensión. C) resultado de un Western blot elaborado a una doble dimensión utilizando anticuerpos específicos para cada complejo. Las flechas muestran la dirección de la primera dimensión (BNE) y de la segunda dimensión (SDS). (Calvaruso et al, 2008)



1.6.3. Zimogramas

Otra opción que se tiene para la identificación de supercomplejos por medio de las técnicas de electroforesis, es la visualización y cuantificación de la actividad enzimática en zimogramas.

La zimografía es una técnica electroforética realizada en condiciones nativas (para evitar la pérdida de la actividad enzimática), que aprovecha las características oxido-reducción de los complejos respiratorios y permite observar su actividad como enzimas, gracias al acoplamiento con reacciones colorimétricas utilizando cromógenos que al ser oxidados o reducidos por su naturaleza cambian de color.

La visualización del complejo I se lleva a cabo utilizando una sustancia cromógena, el nitro azul de tetrazolio (NBT), que tiene un color amarillo en su forma oxidada y funciona como aceptor de protones, los cuales son liberados tras la oxidación del NADH por acción del complejo I, en consecuencia el NBT se reduce para formar un compuesto llamado formazán de color azul. (figura 9)

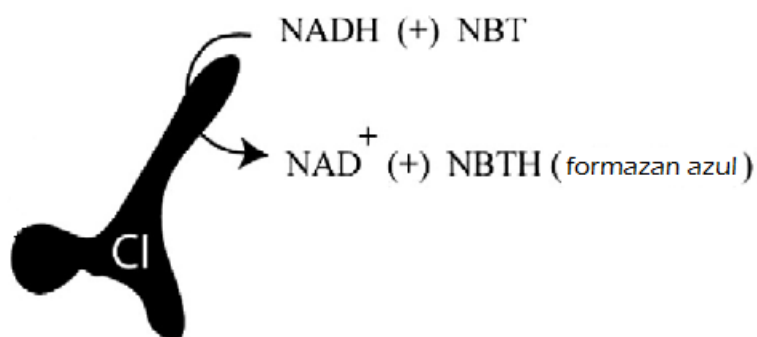
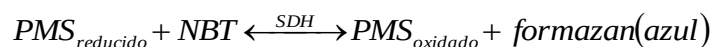


Figura 9: Reacción colorimétrica del zimograma del complejo I. (Modificado de Willis et al, 2009)



La reacción para la visualización del complejo II se lleva a cabo en dos fases, primero el succinato se oxida por acción del complejo II a fumarato y deja libres los electrones que el p-metilsulfóxido (PMS) capta para reducirse, la segunda reacción es que el PMS reducido se oxida de nuevo y el NBT capta sus protones para reducirse y formar el mismo compuesto color azul de la reacción anterior.



Para la visualización del complejo IV también se utiliza un cromógeno, en este caso el DAB, y un donador de electrones que es el citocromo c, este último es oxidado por el complejo IV para posteriormente reducirse y donarle sus electrones al DAB que se oxida y forma un compuesto colorido. (figura 10)

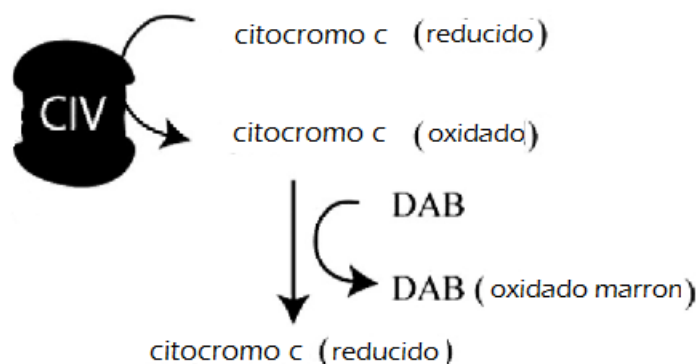
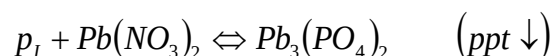


Figura 10: Reacción colorimétrica del zimograma del complejo IV (modificado de Willis et al, 2009).

En la reacción del complejo V se utiliza ATP que es hidrolizado por acción del complejo V dejando libre un fosfato inorgánico, el cual reacciona con el nitrato de plomo agregado para formar un precipitado de fosfato de plomo que se acumula en la banda de la enzima.



1.6.4. Western blot





Una estrategia práctica para la visualización e identificación de los complejos y supercomplejos de la OXPHOS es la inmunodetección por WB (*figura 11*), utilizando anticuerpos específicos para cada complejo. Con estos experimentos, es posible analizar asociaciones en un gel nativo azul, en una doble dimensión y en un gel desnaturalizante clásico, siempre y cuando el epítopo este accesible y reconocible. (Calvaruso et al, 2008)

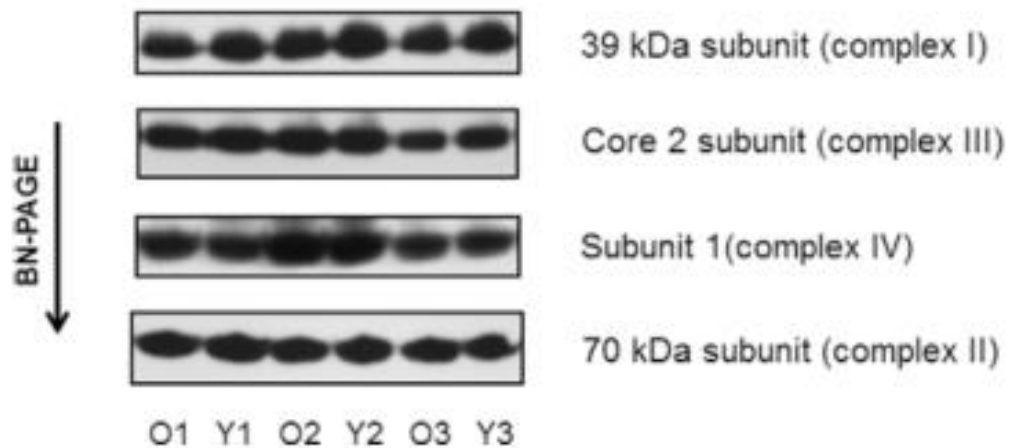


Figura 11: Subunidades mitocondriales identificadas utilizando anticuerpos monoclonales en Western Blot de una electroforesis nativa (Modificado de Gómez et al, 2009)



2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades mitocondriales son poco entendidas y su diagnóstico es complicado debido a que los síntomas son muy variados y pocas veces comunes entre ellas. Este problema se debe a varias causas, una de ellas es que las diferentes mutaciones causantes pueden caer en el DNA mt y DNA n; hasta la fecha, la mayoría de los estudios se han enfocado a este hecho y se han dedicado a caracterizar las mutaciones y polimorfismos del genoma mitocondrial que afectan la expresión de las proteínas que forman los complejos de la cadena respiratoria. Sin embargo, el identificar las mutaciones no aporta información acerca de las posibles alteraciones funcionales y estructurales, estos efectos han sido poco explorados, sobre todo aquellos que tienen que ver con la organización estructural de estos complejos.

Para evaluar los defectos en los complejos de la cadena respiratoria, y determinar si estas mutaciones afectan la actividad, contenido, formación y ensamblaje en supercomplejos, se requiere del uso de metodologías de proteómica como la electroforesis nativa. Esta técnica permite el análisis funcional y estructural de los complejos respiratorios y en los perfiles electroforéticos obtenidos es posible separar individualmente a cada uno de los complejos respiratorios e incluso a los respirosomas, lo cual permite su cuantificación.

Además por medio de reacciones colorimétricas es posible visualizar su actividad como enzimas (zimogramas) (Zerbetto et al, 1997; Wittig et al, 2007), todo esto en un solo ensayo, con una alta sensibilidad y con una cantidad relativamente baja de tejido (20-50 mg), se pueden hacer los análisis correspondientes. Los complejos y respirosomas separados en una electroforesis nativa (1D) pueden ser sometidos a una electroforesis desnaturizante adicional (2D), lo cual es una estrategia muy recurrida en la proteómica para analizar la composición de los complejos y respirosomas separados.





Este tipo de información permitirá analizar si existen variaciones en la cantidad e integridad de los complejos y supercomplejos de la cadena respiratoria en mitocondriopatías para determinar si estas enfermedades se pueden clasificar de acuerdo a defectos que, correlacionan con fallas en el ensamblaje o con una disminución en la cantidad o actividad de los complejos y respirosomas; esto daría una mejor comprensión a nivel molecular de estas enfermedades y podría ser determinante en el diagnóstico de las diversas mitocondriopatías.

Estos datos servirán para posteriormente desarrollar mejores técnicas pronósticas, así como para el desarrollo de fármacos y el impacto de terapias nuevas.



3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo general:*

- Analizar las alteraciones estructurales y funcionales de los complejos respiratorios en las enfermedades mitocondriales por proteómica así como su posible uso como herramientas de diagnóstico

3.2. *Objetivos específicos*

- Estandarizar la técnica de zimogramas en geles nativos claros para evaluar la función de los complejos de la cadena respiratoria.
- Estandarizar las técnicas de dobles dimensiones y Western blot en geles nativos azules para evaluar la estructura de los complejos de la cadena respiratoria.
- Evaluar las alteraciones estructurales y funcionales de los complejos de la cadena respiratoria en pacientes con sospecha de mitocondriopatía.
- Determinar el posible uso de estas metodologías como método de diagnóstico en mitocondriopatías.





4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. *Material biológico*

- Para la estandarización de todas las técnicas se utilizó músculo esquelético disectado de las extremidades de ratones de la cepa cd1.
- Biopsias de músculo de pacientes con sospecha de mitocondriopatía.
- Biopsias de músculo de pacientes sin mitocondriopatía.

4.2. *Reactivos*

- Ácido 6- aminocaproico (EACA); Sigma-Aldrich, USA
- Adenosín trifosfato (ATP); Sigma-Aldrich, USA.
- Desoxicolato (DOC); Research org.
- Diaminobencidina (DAB); Sigma-Aldrich, USA.
- Dimetil sulfóxido (DMSO); J.T. Baker, México
- Ditiotreitrol (DTT); Sigma-Aldrich, USA.
- Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA); J.T. Baker, México
- Lauril maltosido (LM); Sigma-Aldrich, USA.
- Lauril sulfato de sodio (SDS); Sigma-Aldrich, USA.
- Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH); Sigma-Aldrich, USA.
- Nitro azul de tetrazolio (NBT); Sigma-Aldrich, USA.
- p- metil sulfóxido (PMS); Sigma-Aldrich, USA.
- Trietilamina (TEA); Sigma-Aldrich, USA.
- Acrilamida; Bio Rad
- Azul de Comassie G; Sigma-Aldrich, USA.
- Citocromo c; Sigma-Aldrich, USA.
- Cloruro de sodio NaCl; Sigma-Aldrich, USA.
- Glicina; Sigma-Aldrich, USA.
- Imidazol; Sigma-Aldrich, USA.
- Kit de quimioluminiscencia; Millipore
- Kit tinción con plata; Bio Rad
- Metanol; J.T. Baker, México
- Nitrato de Plomo; Sigma-Aldrich, USA.
- Sacarosa; Sigma-Aldrich, USA.
- Succinato de sodio; Sigma-Aldrich, USA.
- Tricina; Sigma-Aldrich, USA.
- Tris base; Sigma-Aldrich, USA.





4.3. Métodos

Se trabajó con los tres tipos de muestra mencionados anteriormente, de los cuales se obtuvieron: mitocondrias puras extraídas por centrifugación diferencial y extractos crudos mitocondriales (tejido) por una solubilización directa. Se realizaron las técnicas de electroforesis nativa, zimogramas, dobles dimensiones, y western blot de geles nativos, desnaturalizantes y dobles dimensiones desnaturalizantes. (figura 12)

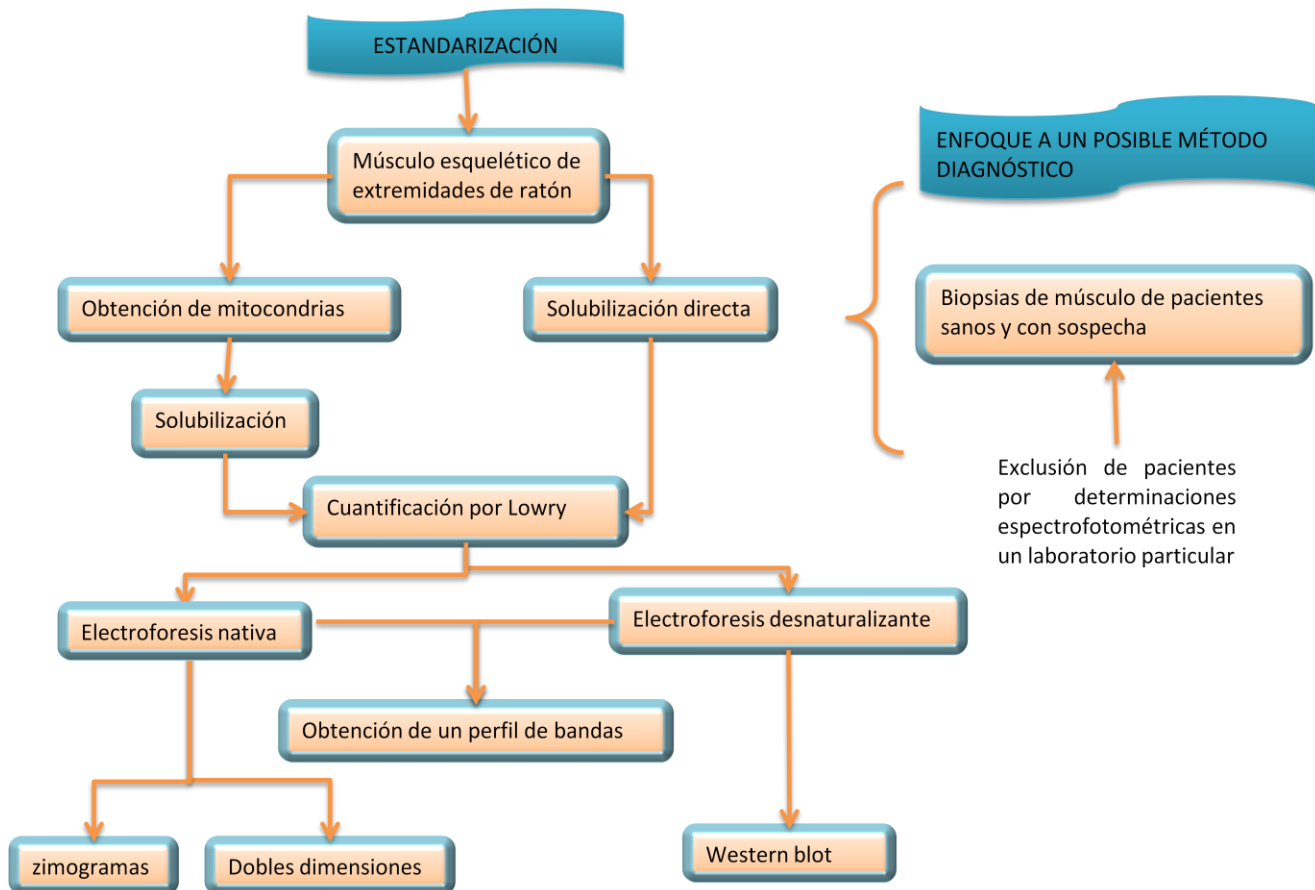


Figura 12: Diagrama general de la metodología seguida.



4.3.1. Obtención de mitocondrias por centrifugación diferencial

- El músculo esquelético de ratón se pesó y homogenizó mecánicamente en un homogenizador de vidrio con medio de aislamiento (TEA 3mM, EDTA 1 mM sacarosa 250 mM pH 7.4) a una concentración final del 5% P/V a 4°C y con inhibidores de proteasas.
- Se centrifugó a una velocidad baja (756xg/10'/4°C), y se recuperó el sobrenadante.
- Se centrifugó a una velocidad alta (3,024xg/10'/4°C), recuperando el sedimento.
- El sedimento se resuspendió en el volumen mínimo posible de sacarosa 250mM, homogenizando con ayuda de un pincel.
- Se realizaron alícuotas de 100 µL aproximadamente y se almacenaron a -20°C para su posterior solubilización.

4.3.2. Obtención de extractos crudos mitocondriales

- Se pesaron de 10-80 mg de cada una de las muestras y se homogenizaron con 600µL de un amortiguador de homogenización (fosfatos 20mM, pH 7 y sacarosa 250mM).
- Se centrifugó (16.1xg/10'/4°C) y se obtuvo un sedimento con la fracción enriquecida de mitocondrias para su posterior solubilización.
- La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Lowry (Lowry, et al, 1951). Solo las mitocondrias se cuantificaron antes de solubilizar; ambas muestras (mitocondrias y tejido) deben cuantificarse al finalizar la solubilización.





4.3.3. Solubilización

- Para la solubilización se utilizaron los dos detergentes: LM (10%) y digitonina (20% en DMSO).
- En la solubilización de mitocondrias se usaron mitocondrias frescas o almacenadas, estas se centrifugaron a 10,200rpm/10'/4°C, se recuperó el sedimento y se resuspendió en un amortiguador de solubilización (imidazol 50mM pH 7, EACA 2mM, EDTA 1mM, NaCl 50 mM).
- El detergente se agregó lentamente en alícuotas, una vez añadido, el solubilizado se dejó incubar con agitación a 4°C/15-30 min. Ambos detergentes se utilizaron a una relación 2.5mg/mg de proteína.
- Para las fracciones mitocondriales se siguió el mismo procedimiento, pero la relación de detergente utilizada fue 20μL (10%)/7.5mg.
- Después de la incubación, las muestras se ultracentrifugaron (40,000rpm/40'/4°C), el sobrenadante se recuperó para utilizarse inmediatamente o se almacenó a -20°C durante máximo dos semanas.

4.4. Geles desnaturalizantes

- Para verificar la calidad de las preparaciones así como para realizar algunas de las inmunodetecciones tipo WB, se usó a la electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida.
- El método que se utilizó fue el sistema discontinuo de Laemmli, (Laemmli 1970) en este caso se utilizó un gel separador al 12% y concentrador al 5%. Los geles así preparados se corrieron a 100 volts durante 2 horas.



4.4.1. Geles nativos azules y claros en gradiente

- Los geles nativos se prepararon en un gradiente del 5% al 13%, (figura 13). Se utilizó un amortiguador de imidazol 25 mM y EACA 0.5M y acrilamida en su preparación.
- El sistema de amortiguadores usado requiere uno de ánodo y otro de cátodo. Con amortiguador de ánodo (imidazol 25 mM) para ambos geles, y de cátodo para gel claro (tricina 50mM, imidazol 7.5 mM, lauril maltosido 0.02%, desoxicolato 0.05% pH 7) y para gel azul (tricina 50mM, imidazol 7.5 mM, azul de Comassie G 0.02%). (Wittig *et al*, 2007) (figura 13)
- El gel se corrió a 30 volts/ 500 mA / 17 hrs/ 4°C.

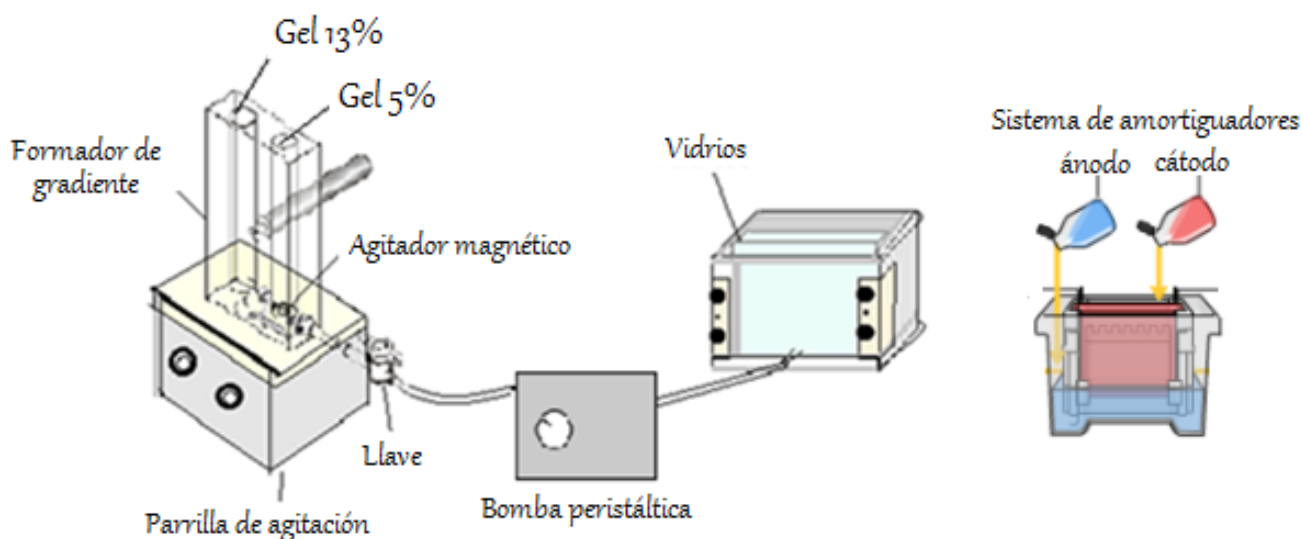


Figura 13: Montaje para la preparación de geles en gradiente.



4.4.2. Doble dimensión desnaturalizante

- Una vez que se realizó la electroforesis nativa (1D) se cortó el carril correspondiente a la muestra de interés, y se incubó 20 minutos con DTT 10mM y SDS 0.1%. La tira así tratada se corrió perpendicularmente en una electroforesis desnaturalizante al 12 %, como se muestra en la *figura 14*.
- El gel se corrió a 100 volts, 1hr y se tiñó (40% metanol, 10% ácido acético, 0.1% azul de comassie), o se transfirió para realizar un Western blot.

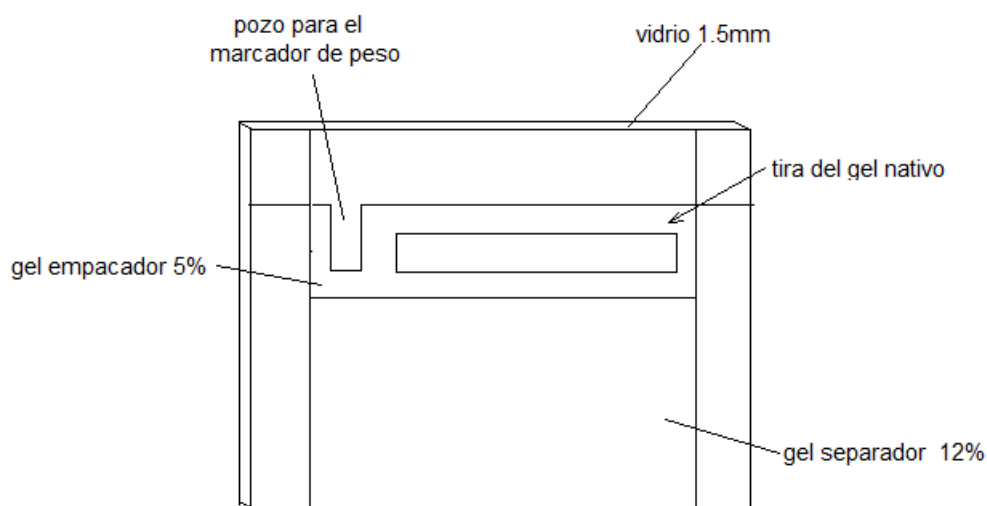


Figura 14: Realización de un gel en 2D



4.4.3. Western blot

- Las muestras separadas en los geles se transfirieron a una membrana de PVDF. La transferencia se realizó en un amortiguador de Towbin (tris base 0.3% p/v, glicina 1.44% p/v, metanol 10% v/v) (Towbin al, 1979). Para las transferencias de geles nativos, la fuente de poder se utilizó a 100 mA/1.5 hrs/4°C, y para desnaturalizantes se realizó a 100V/1hr o 16hrs/30 V.
- Una vez que se realizó la transferencia se continuó con la etapa de bloqueo para evitar el pegado inespecífico de anticuerpos a la membrana, se incubó la membrana con agitación suave en leche libre de grasa al 5% en PBS-T durante al menos una hora a temperatura ambiente.
- Después del bloqueo se añadió el anticuerpo primario correspondiente y se incubó durante una noche en agitación a 4°C. Los anticuerpos utilizados son monoclonales y reconocen una subunidad de cada uno de los complejos, se probaron diferentes concentraciones de cada anticuerpo para llegar a las óptimas (ver resultados).
- Una vez que se unió el anticuerpo primario se incubó con el secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP), para esto se realizaron 3 lavados cada 15 minutos con PBS-T, se agregó el anticuerpo secundario y se dejó en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron tres lavados cada 15 minutos con PBS-T para pasar a la etapa de detección por quimioluminiscencia.
- Se agregó la solución de quimioluminiscencia (kit millipore) en la superficie de la membrana por cinco minutos. Pasado este tiempo se retiró la solución, en un cuarto oscuro se colocó una placa radiográfica encima de la membrana y se dejaron exponer en un cassette durante 10 minutos.





4.4.4. Zimogramas

- Se cortaron los carriles del gel nativo que se deseaban determinar por zimografía y se incubaron con los reactivos correspondientes. (*Tabla 3*).
- Se dejaron reaccionar los geles en incubación con los reactivos por 24 hrs.

Tabla 3: Reactivos utilizados en la determinación de actividad por zimogramas

Complejo	Amortiguador (5ml)	Reactivos	[final]
I	Tris 5 mM pH 7.4	NBT	2.4 mg/mL
		NADH	0.09 mg/mL
II	Tris 5 mM pH 7.4	Succinato de sodio	4x10 ⁻³ M
		PMS	0.04 mM
		NBT	2.4 mg/mL
IV	Buffer de actividad	ATP	1 mM
		Pb	0.01 grs.
V	Buffer de fosfatos	Citocromo C	0.05 Mm
		DAB	0.52 mg/mL





5. RESULTADOS

Los experimentos realizados se estandarizaron primero con muestras de músculo esquelético de ratón, de donde se obtuvieron dos tipos de fracciones: fracciones mitocondriales enriquecidas (tejido) y mitocondrias purificadas por centrifugación diferencial (*Figura 15 y 16*). Una vez que se obtuvieron perfiles reproducibles, los experimentos se realizaron con muestras de pacientes sanos y con sospecha de mitocondriopatía.

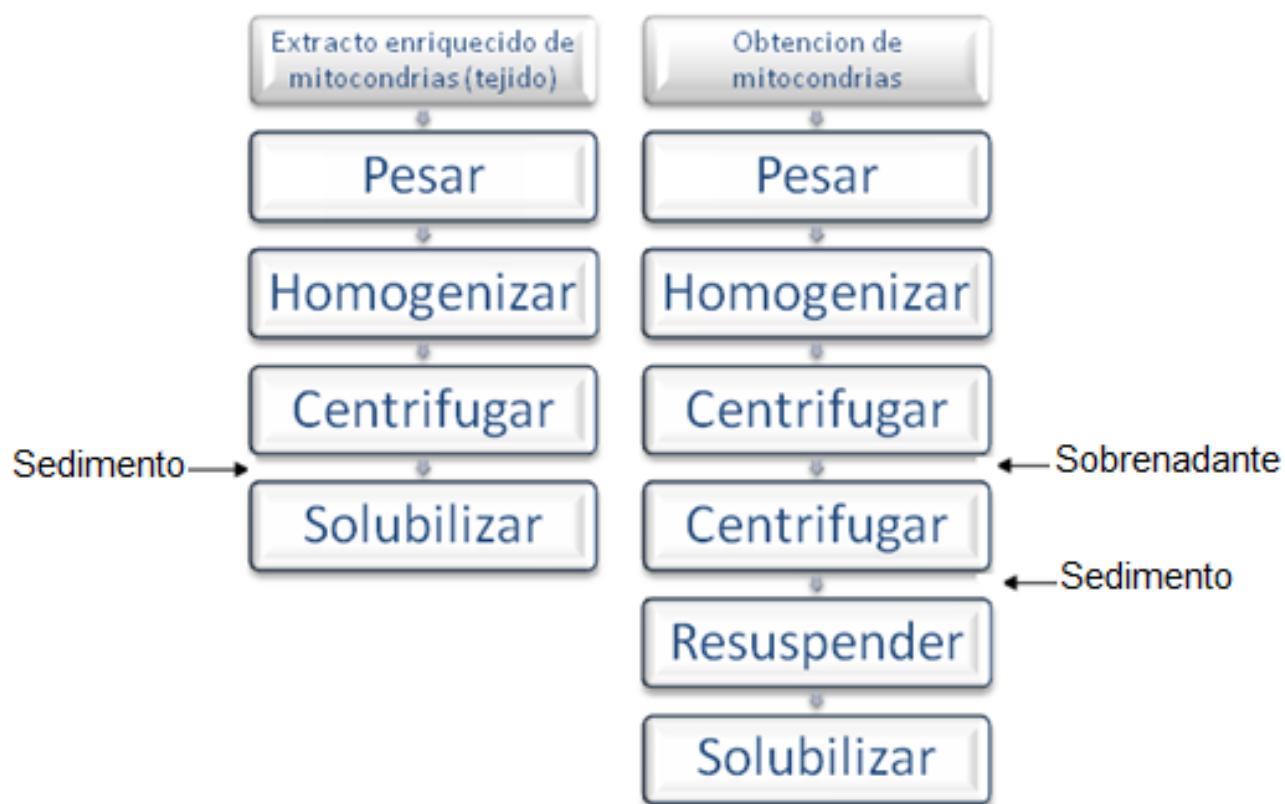


Figura 15: Diagrama general para la obtención de mitocondrias purificadas y extractos mitocondriales enriquecidos.



5.1. Estandarización de las condiciones para un Western blot

Para corroborar la calidad e identidad de las preparaciones, se utilizaron extractos totales de mitocondrias antes de solubilizar, con esta prueba se confirmó la presencia de una subunidad de cada complejo (I, II, III, IV y V) de la cadena respiratoria reconocida por anticuerpos monoclonales mediante la inmunodetección por WB, se utilizó un carril diferente para cada ensayo, lo que demuestra que en efecto trabajamos con mitocondrias. Las condiciones óptimas halladas para la inmunodetección de los complejos en el WB se muestran en la *tabla 4*.

Tabla 4: Estandarización de las concentraciones a utilizar de cada anticuerpo primario

Complejo al que está dirigido el anticuerpo	Peso de la subunidad que reconoce	Concentración final
I	37 kDa.	0.8 µg /mL
II	< 70 kDa.	0.1 µg / mL
III	48.44 kDa	0.8 µg /mL
IV	19.58 kDa	0.8 µg /mL
V	beta > 50 kDa.	1:1000

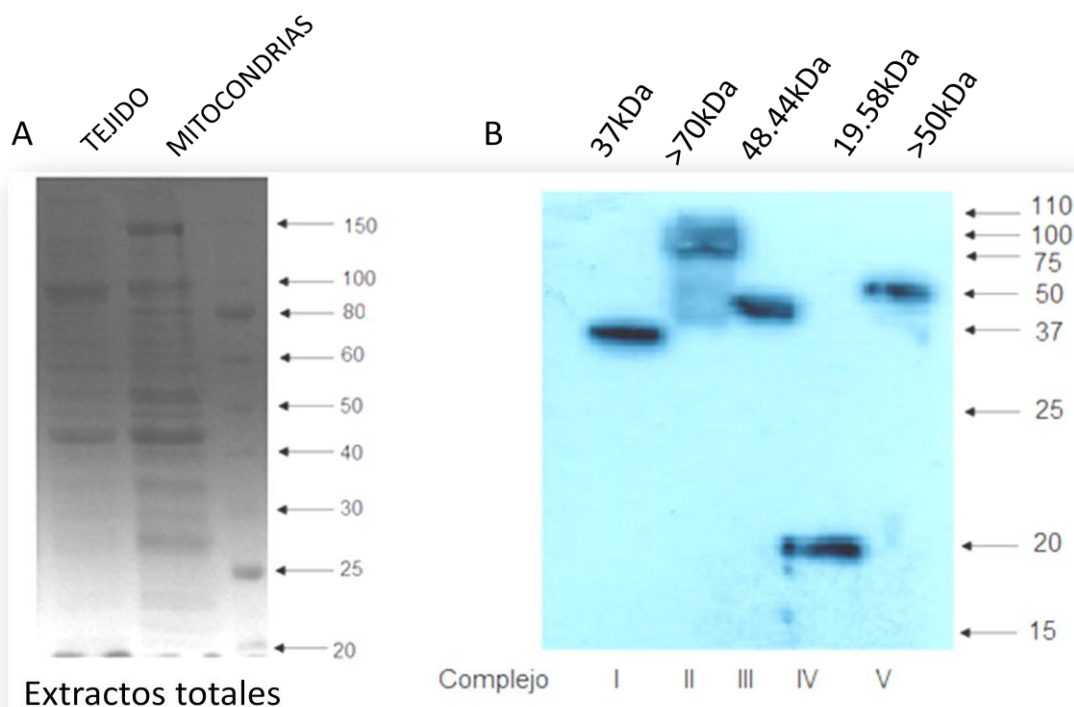


Figura 16: a) Subunidades mitocondriales de extractos totales de ratón separadas por electroforesis desnaturalizante (12%). A) tinción con Comassie. B) subunidades de los complejos de la OXPHOS detectadas por WB de un extracto total mitocondrial

En la figura 16 puede verse solo una banda de reacción para cada inmunoensayo, en el peso molecular correspondiente al peso de la subunidad mitocondrial detectada por el anticuerpo (*tabla 4*).

5.2. Estandarización de las condiciones de solubilización y gel nativo.

Para determinar las condiciones de solubilización con los detergentes LM y digitonina se hicieron curvas de concentración de los mismos, se revisaron y compararon los perfiles BNE obtenidos con los ya reportados, (*figura 17*). También se determinó la cantidad óptima de proteína a utilizar para su visualización en la tinción con Comassie (*figura 18*).

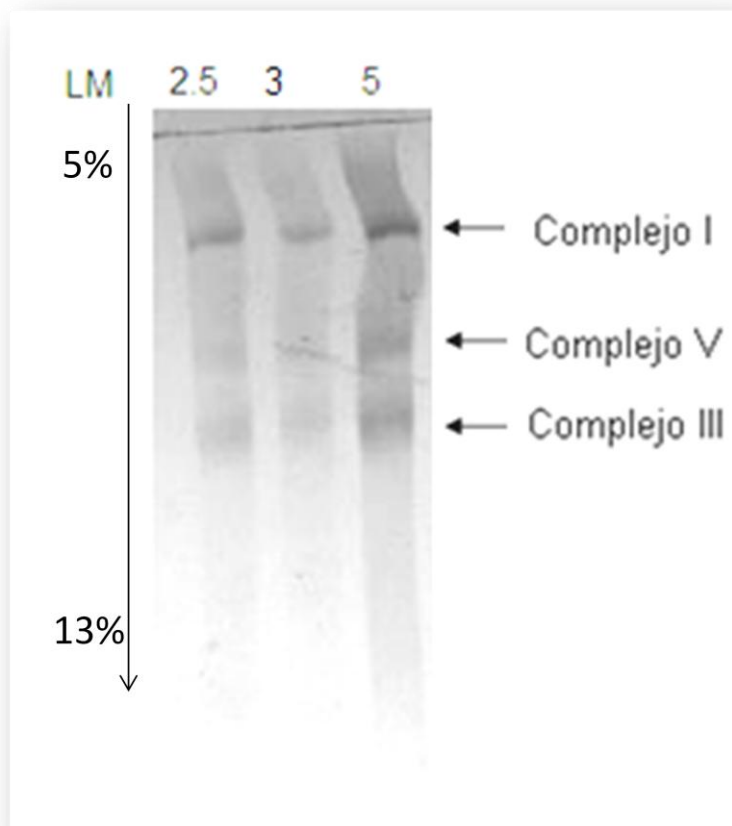


Figura 17: Curva de concentración de detergente en una electroforesis nativa azul en gel de poliacrilamida en gradiente (5% -13%), de mitocondrias solubilizadas con LM.

Con estos experimentos se determinó que las mejores condiciones para visualizar las proteínas es utilizando 30 μg , tanto en mitocondrias como en tejido (*figura 18*), y 2.5 de detergente para mitocondrias solubilizadas con LM (*figura 17*) y con digitonina (*figura 25*), por ser ésta la intermedia en cuanto a visibilidad, y permitir utilizar una pequeña cantidad de detergente. Se estableció también que se requiere solubilizar aproximadamente 50 mg de tejido, cargar 30 -50 μg en los geles y correr la electroforesis durante toda la noche.

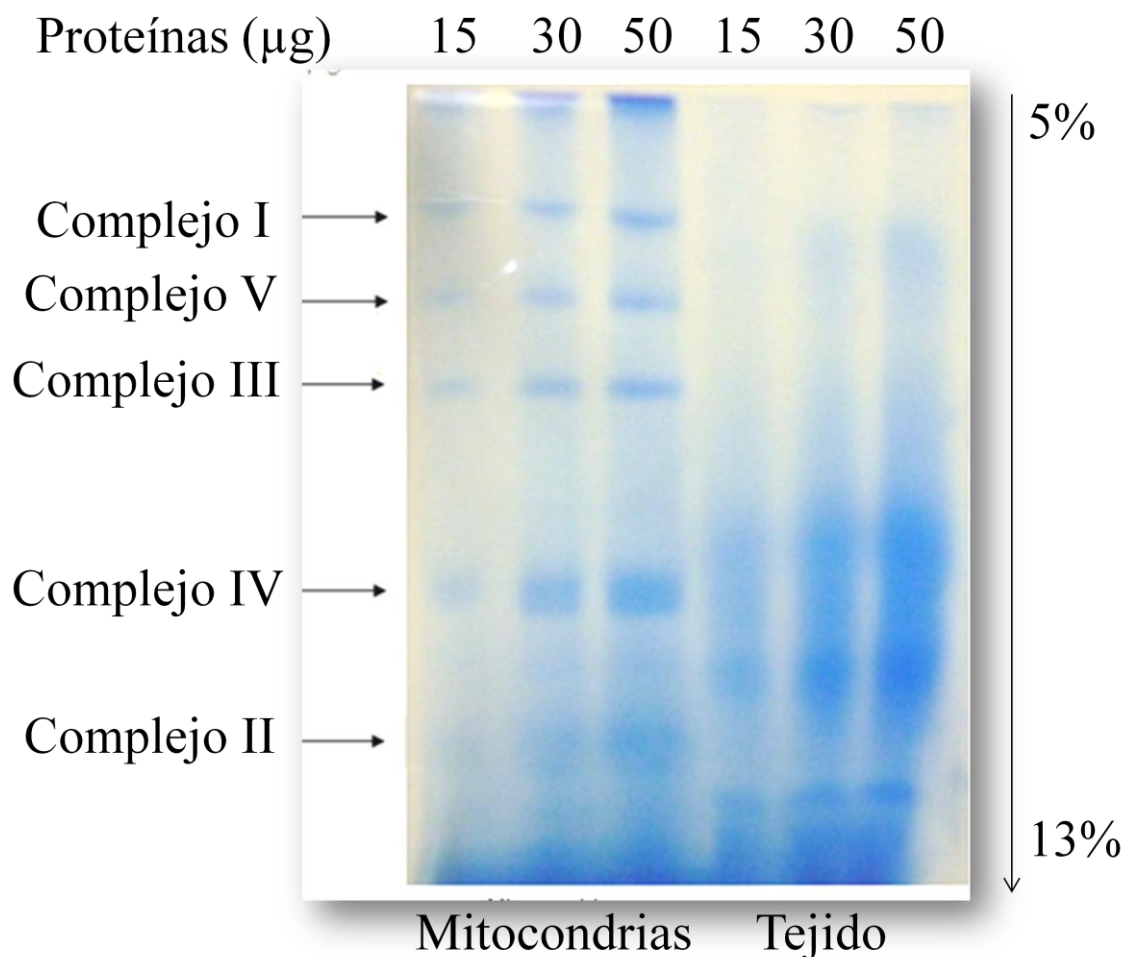


Figura 18: Curva de cantidad de proteínas en una electroforesis nativa azul en gel de poliacrilamida en gradiente (5% -13%), de mitocondrias y tejido solubilizados con LM

5.3. Estandarización de condiciones para los zimogramas

Para identificar los complejos respiratorios en los perfiles de las muestras de tejido y mitocondrias se desarrolló una prueba de zimografía que permitiera visualizar la reacción de los complejos de la OXPHOS en geles nativos. Para estos experimentos se probaron dos tipos de electroforesis; la BNE (azul) y hr-CNE (clara), la actividad se determinó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

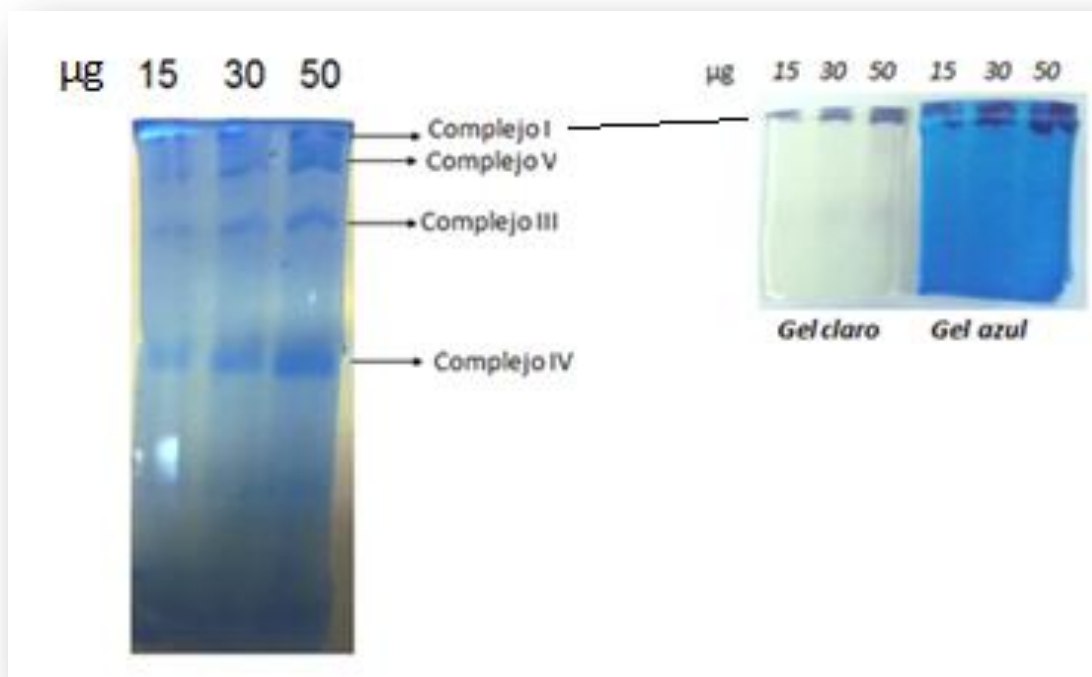


Figura 19: Ensayo catalítico del complejo I mitocondrial en geles nativos claro y azul, de mitocondrias purificadas de ratón solubilizadas con LM, a) tinción con Comassie, b) reacción catalítica.

Se determinó la actividad correspondiente a la reacción del complejo I, mediante el zimograma en geles nativos. La banda azul indica la reducción del NBT por acción del complejo I, la visualización resultó con una mejor resolución en los geles claros (*figura 19*).

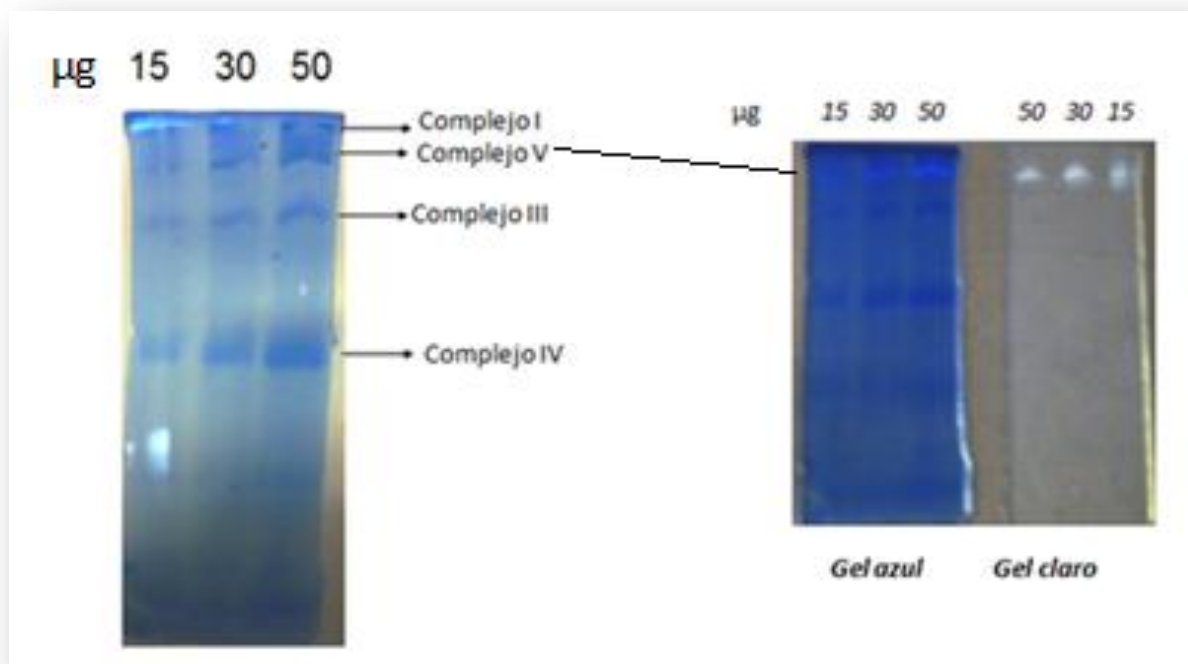


Figura 20: Ensayo catalítico del complejo V mitocondrial en geles nativos claro y azul, de mitocondrias de ratón solubilizadas con LM, a) tinción con Comassie, b) reacción catalítica

Se determinó la presencia del complejo V, la cual se observa como una banda color blanco correspondiente a un precipitado de fosfato de plomo, debajo de la determinada para el complejo I. La banda correspondiente a este complejo no es muy evidente en el gel azul, en el gel claro como se observa la banda es visible desde los 15µg de proteína (*figura 20*).

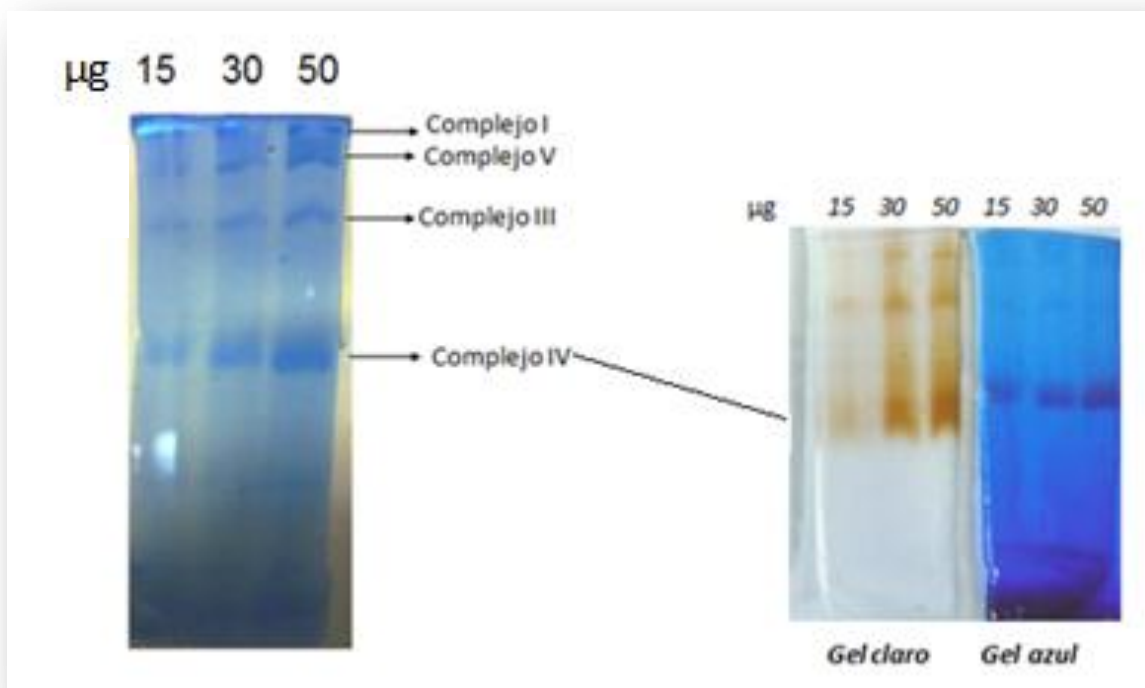


Figura 21: Ensayo catalítico del complejo IV mitocondrial en geles nativos claro y azul, de mitocondrias de ratón solubilizadas con LM, a) tinción con Comassie, b) reacción catalítica

La actividad del complejo IV se observa mediante la presencia de una banda color marrón debajo de las bandas de los complejos I y V en los geles claros y azules. La banda correspondiente a este complejo se define mejor en el gel claro, y desde 15 µg de proteína es posible identificarlo (*Figura 21*).

Una vez establecidas las mejores condiciones para estos ensayos, se realizaron también en fracciones mitocondriales enriquecidas (tejido). Aunque el perfil de bandas es más difícil de identificar en la tinción con Comassie, la identificación con los zimogramas específicos mostró la disposición de los complejos en el gel que, en general muestran un perfil similar a los obtenidos en mitocondrias donde se observa la sucesión descendente de los complejos I, V, III, IV y II (*figura 22*).

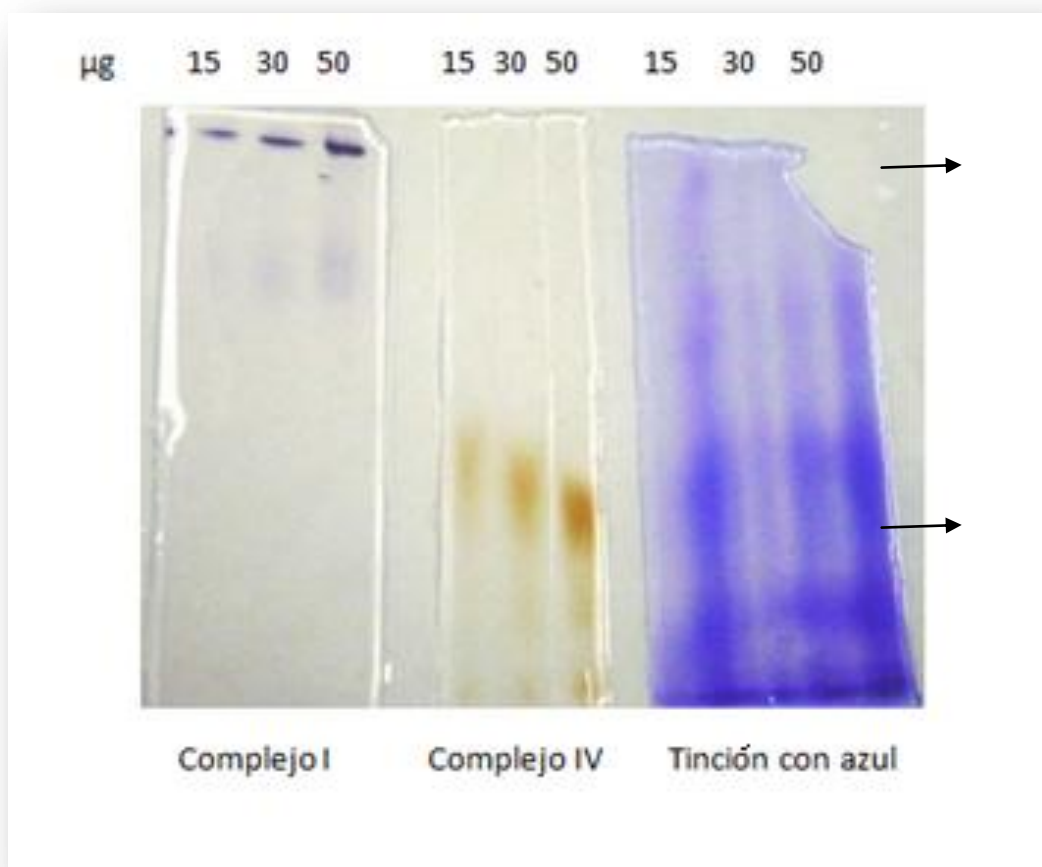


Figura 22: Ensayo catalítico de los complejos mitocondriales I y IV en un gel nativo claro, de una fracción mitocondrial enriquecida de ratón solubilizada con LM.

Tras la estandarización de esta técnica en tejido y mitocondrias puras de ratón, el ensayo se aplicó a tejido humano, y se realizó la comparación de los perfiles. Los resultados mostraron que los perfiles son muy similares.

Es importante mencionar que aunque se logró obtener mitocondrias purificadas de tejido humano utilizando una biopsia de gran tamaño, solo se obtuvo una cantidad pequeña de proteínas que no permitió realizar repeticiones ni ensayos diferentes, por esta razón y ya que las biopsias humanas son pequeñas y limitadas, se decidió utilizar extractos enriquecidos (tejido) de las muestras humanas en lugar de mitocondrias purificadas.

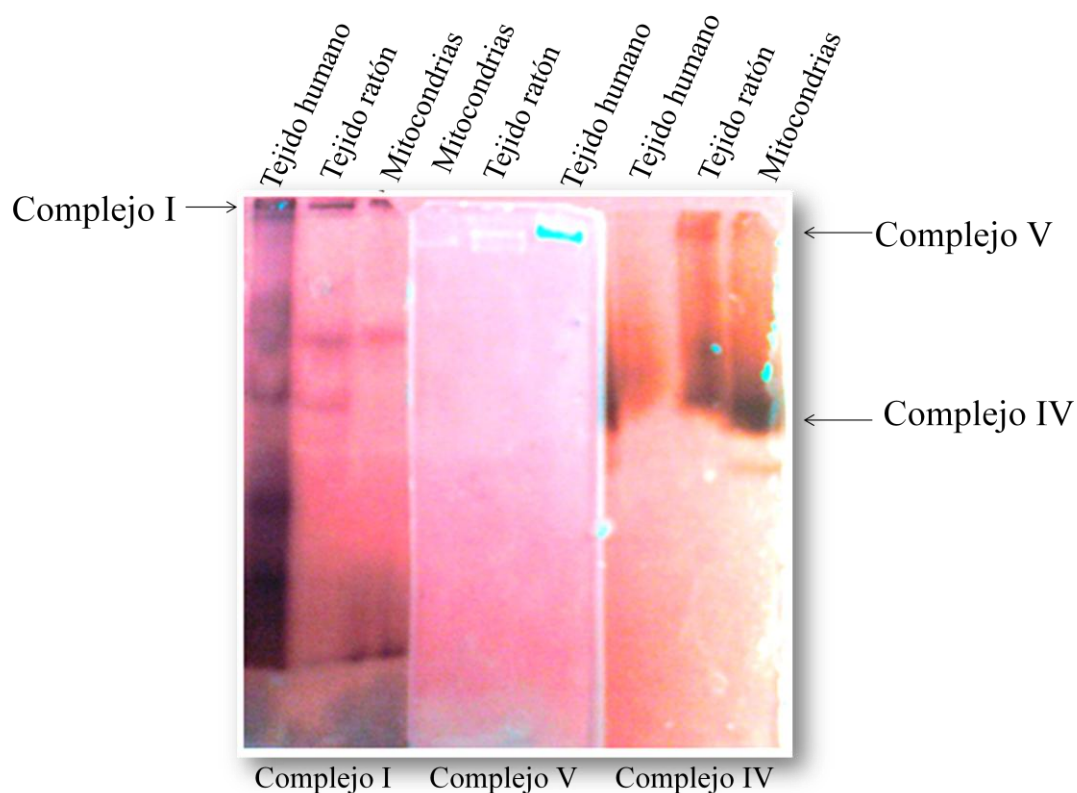


Figura 23: Comparación de los ensayos catalíticos de los complejos I, IV y V en un gel nativo claro, de las tres preparaciones

La determinación de la actividad de los complejos I, IV y V, (*figura 23*) permitió identificar las bandas correspondientes. Cabe señalar que hubo algunas diferencias entre la intensidad de las bandas de reacción, fue más evidente en el caso del complejo V donde el complejo de humano fue más activo, también el complejo I se observa con más intensidad en la muestra de humano, en las tres preparaciones se observaron bandas de reacción de menor peso, esto sucedió cuando las preparaciones llevaban un tiempo prolongado de almacenamiento.



5.4. Separación y detección de complejos y supercomplejos por Western blot y zimogramas

Como se mencionó anteriormente, se utilizaron dos detergentes: LM y digitonina, los cuales solubilizan de distinta manera para obtener complejos respiratorios principalmente monoméricos en el primer caso y supercomplejos en el segundo. Para comprobar que los detergentes solubilizaban de esta manera y para ver las diferencias entre los productos de la solubilización se realizó una inmunodetección para cada complejo en un gel nativo azul.

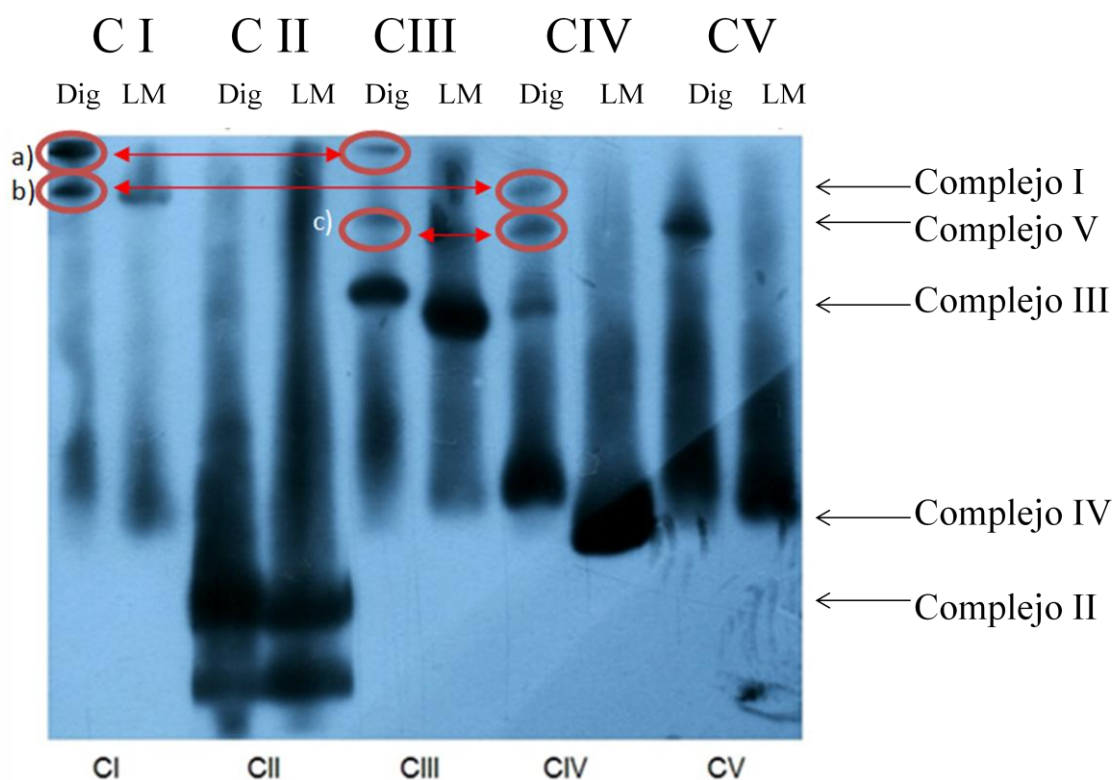


Figura 24: Complejos y supercomplejos de mitocondrias de ratón solubilizadas con LM y digitonina detectados por WB en una electroforesis nativa azul utilizando 30 μ g de proteína. a) Posible supercomplejo de I y III, b) posible supercomplejo de I y IV, c) posible supercomplejo de III y IV

Se determinó la presencia de los complejos y posibles asociaciones de los supercomplejos en las preparaciones solubilizadas con LM y digitonina (*figura 24*). La inmunodetección para cada uno de los complejos muestra bandas correspondientes a cada complejo individual, en las preparaciones solubilizadas con LM, y bandas de mayor peso en los solubilizados con digitonina, las cuales corresponden a supercomplejos.



Las asociaciones entre complejos también pueden ser corroboradas por los zimogramas, de hecho es posible determinar la composición de complejos de una banda comparando las bandas que coinciden para cada reacción en específico. Aunque la carencia de método para el complejo III limita la identificación.

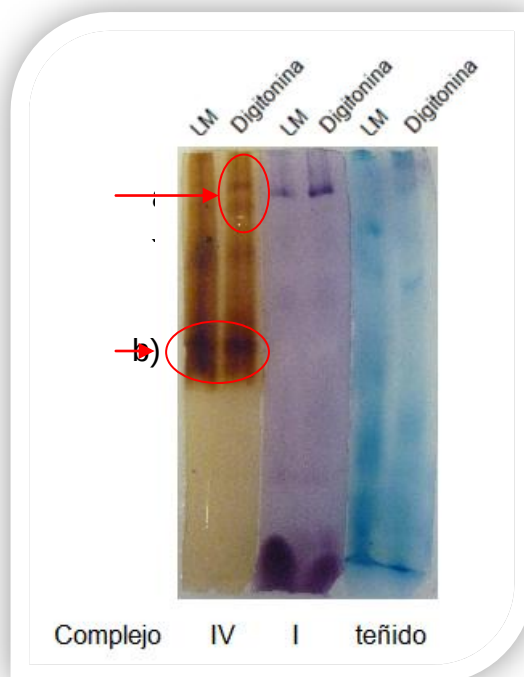


Figura 25: Ensayo catalítico de los complejos I y IV en un gel nativo claro con mitocondrias de ratón solubilizadas con LM y digitonina. a) Bandas que corresponden a supercomplejos con el complejo IV, b) bandas correspondientes al complejo IV monomérico.

Se determinó la actividad de los complejos I y IV a muestras solubilizadas con digitonina y LM, mediante zimogramas (*figura 25*). Además se determinó la presencia de supercomplejos en los solubilizados con digitonina que se visualizan en las bandas de reacción de mayor peso molecular que en la de los solubilizados con LM.

Estos resultados demuestran la presencia de supercomplejos, y algunas formas de identificar su composición, lo cual confirma que los zimogramas y el WB son herramientas útiles para su identificación.



5.5. *Electroforesis en dos dimensiones.*

Se llevó a cabo también el análisis de la composición de los complejos en mitocondrias y tejido mediante la electroforesis desnaturalizante en 2D. Con estos experimentos se separan los complejos y supercomplejos en sus subunidades de tal manera que se logra hacer un análisis más fino acerca del contenido de cada banda. Los geles obtenidos fueron teñidos con Comassie y aunque es posible distinguir varias bandas teñidas, la resolución de las mismas no es muy buena, para mejorar este aspecto, se probó la tinción con plata, los geles tratados con esta técnica muestran una mejor definición de bandas, lo que facilitaría la visualización y comparación entre muestras diferentes (*figura 26 y 27*). Estos experimentos fueron realizados en: mitocondrias de ratón, tejido de ratón y tejido humano.



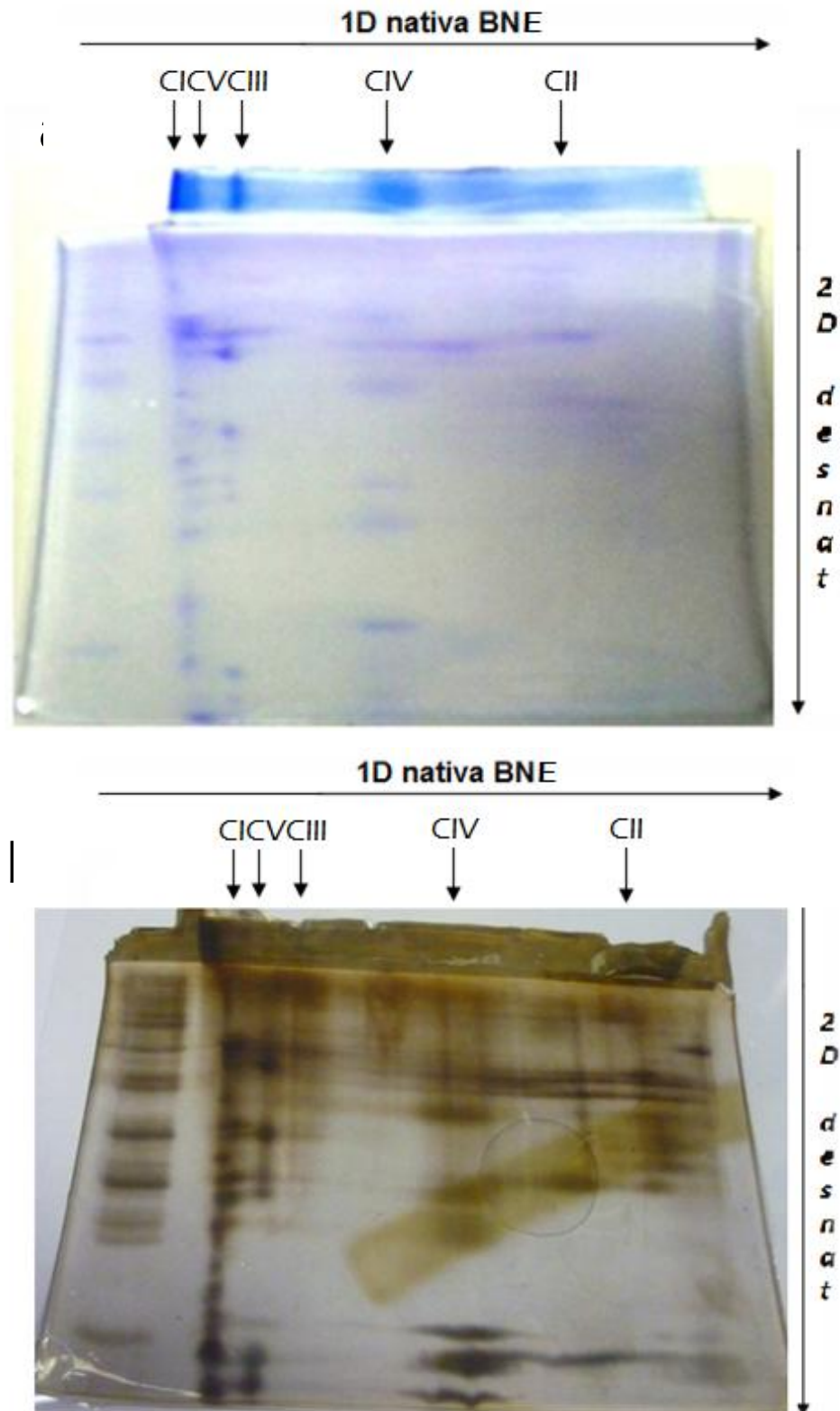


Figura 26: Subunidades mitocondriales separadas por electroforesis en 2D desnaturalizante de mitocondrias de ratón solubilizadas con LM, a) tinción con Comassie, b) tinción con plata.

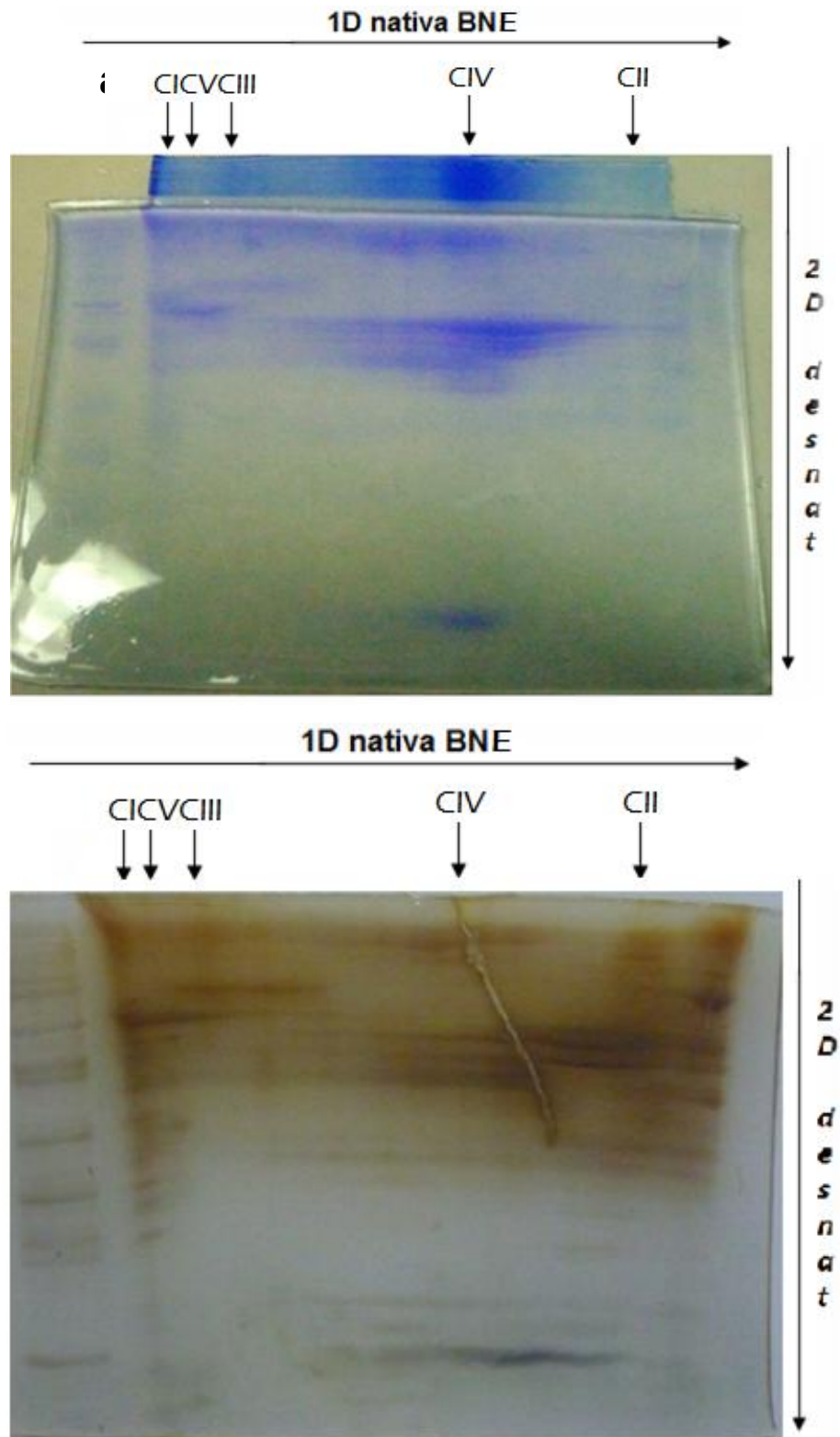


Figura 27: Subunidades mitocondriales separadas por electroforesis en 2D desnaturalizante de tejido de ratón solubilizado con LM, a) tinción con Comassie, b) tinción con plata.

5.6. Identificación de complejos y supercomplejos por doble dimensión y Western Blot

Una de las maneras en que se puede analizar la distribución y contenido de complejos es por WB. En estos experimentos se hizo una BNE, seguida de una doble dimensión desnaturizante, los geles de esta última fueron transferidos a una membrana de PVDF y se realizó la inmunodetección con una mezcla de cuatro anticuerpos usados para los complejos I, II, IV y V. Las muestras analizadas fueron solubilizadas con LM (*figura 28 y 29*).

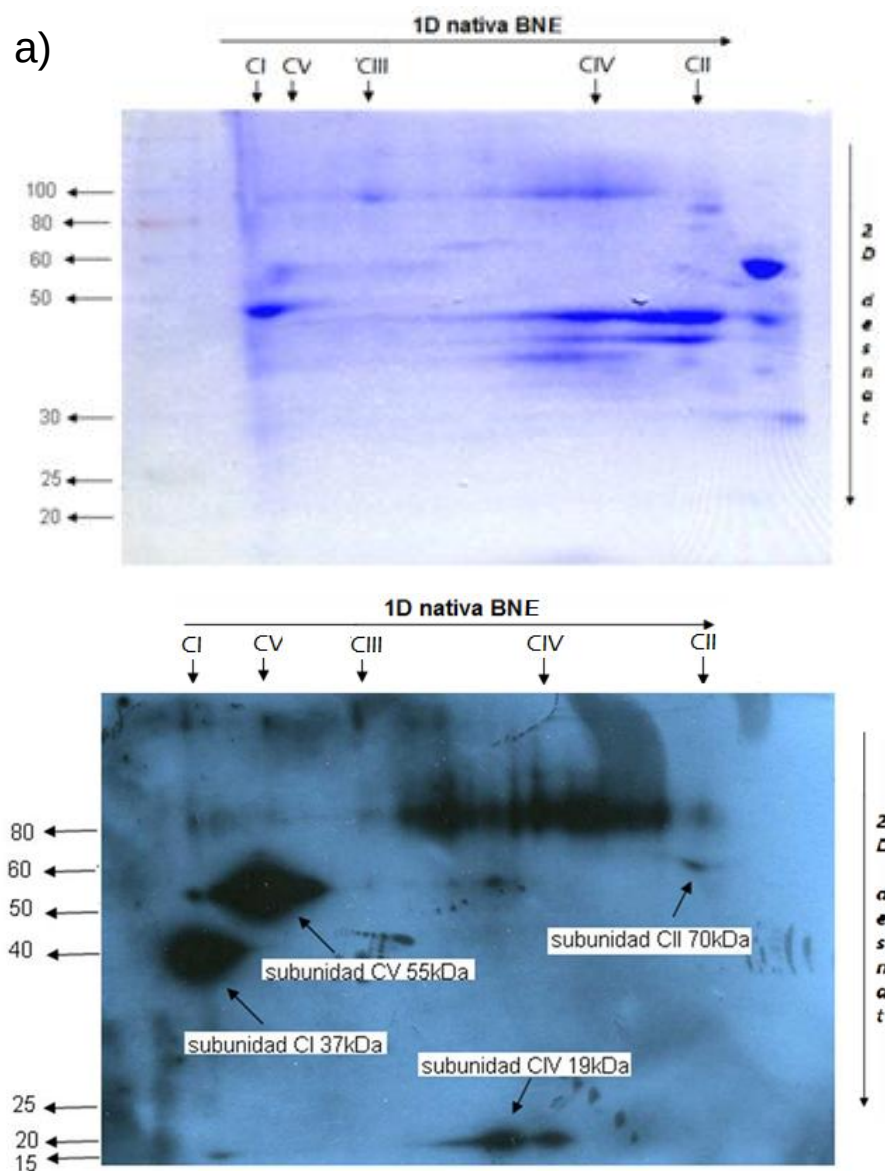


Figura 28: Subunidades mitocondriales de tejido humano sano solubilizado con LM detectadas por Western Blot en una electroforesis 2D. a) Tinción con Comassie, b) inmunodetección

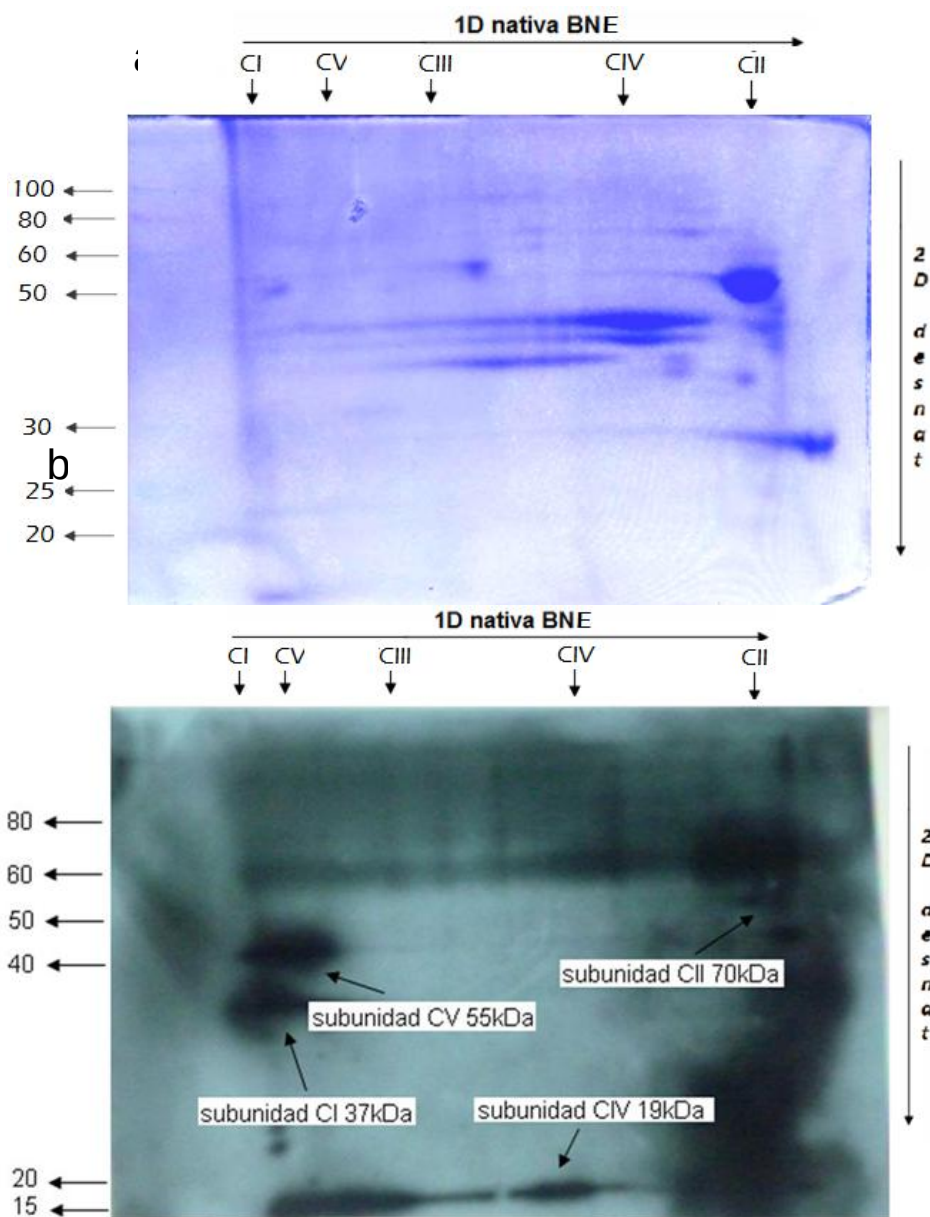


Figura 29: Subunidades mitocondriales de tejido de ratón solubilizado con LM detectadas por Western blot en una electroforesis en 2D. a) Tinción con Comassie, b) inmunodetección.

Como se observa en las imágenes se detectó una banda de reacción correspondiente a cada subunidad que es reconocida por cada anticuerpo, es decir, se observaron cuatro bandas en el peso molecular correspondiente al tamaño de la subunidad detectada. Las señales de reacción en el tejido humano son más intensas con respecto al tejido del ratón, lo que nos afirma que este ensayo puede aplicarse a muestras de pacientes.



5.7. Estudio de un paciente con posible mitocondriopatía.

Durante el tiempo en que se desarrolló este trabajo, se presentaron 4 casos de paciente con probable mitocondriopatía. De estos pacientes se hizo una prueba espectrofotométrica para determinar si tenían algún defecto real. Solo uno mostró diferencias en sus lecturas espectrofotométricas (ver Anexo). Se realizó el análisis de un paciente femenino, de 18 años de edad, con diagnóstico probable de mitocondriopatía. A partir de un extracto mitocondrial (tejido) derivado de una biopsia de músculo esquelético se obtuvo un extracto solubilizado con LM y uno con digitonina. Para establecer primero un defecto en la actividad de los complejos respiratorios, se usó LM y se separó por hr-CNE para hacer los zimogramas correspondientes (*Figura 30*).

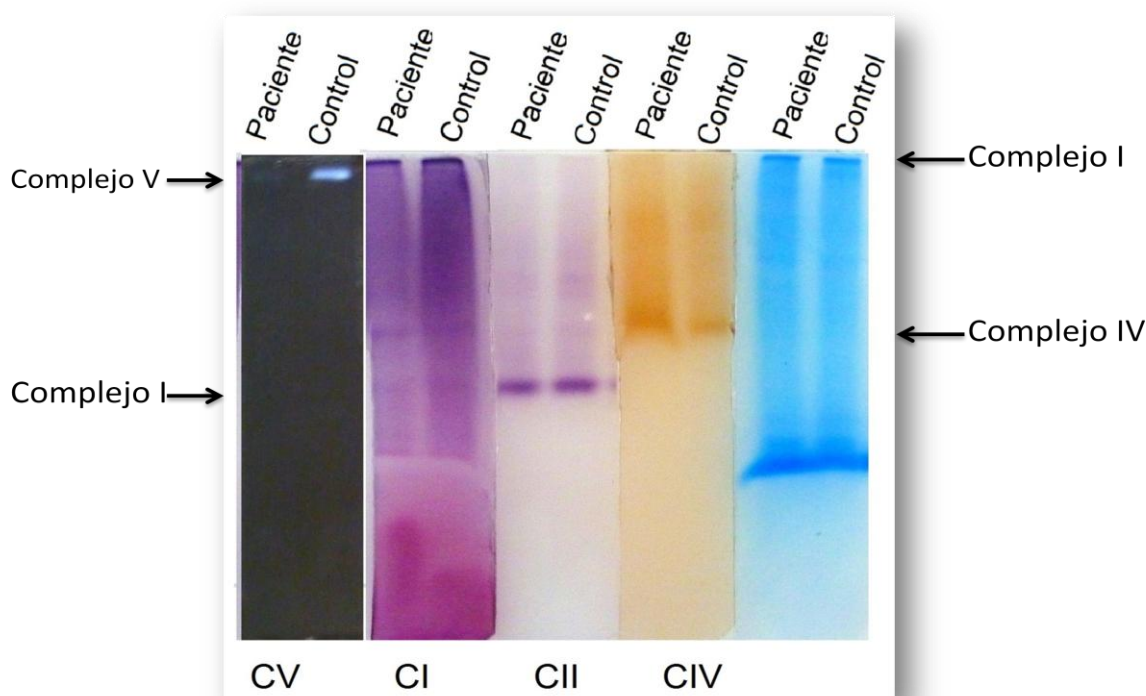


Figura 30: Complejos mitocondriales de tejido del paciente y control solubilizados con LM, separados por electroforesis nativa clara, detectados por zimogramas.

En estos ensayos se encontró que la actividad de los complejos I, II y IV son similares en el paciente y en el control, es decir, su función no se encontró alterada mediante el zimograma. El ensayo para el complejo V sí muestra diferencia y se visualiza una banda menos intensa en la muestra del paciente respecto al control.





Para analizar si había diferencias en la distribución de los complejos y supercomplejos, se comprobó la presencia de las cinco subunidades mitocondriales mediante WB en un gel desnaturalizante.

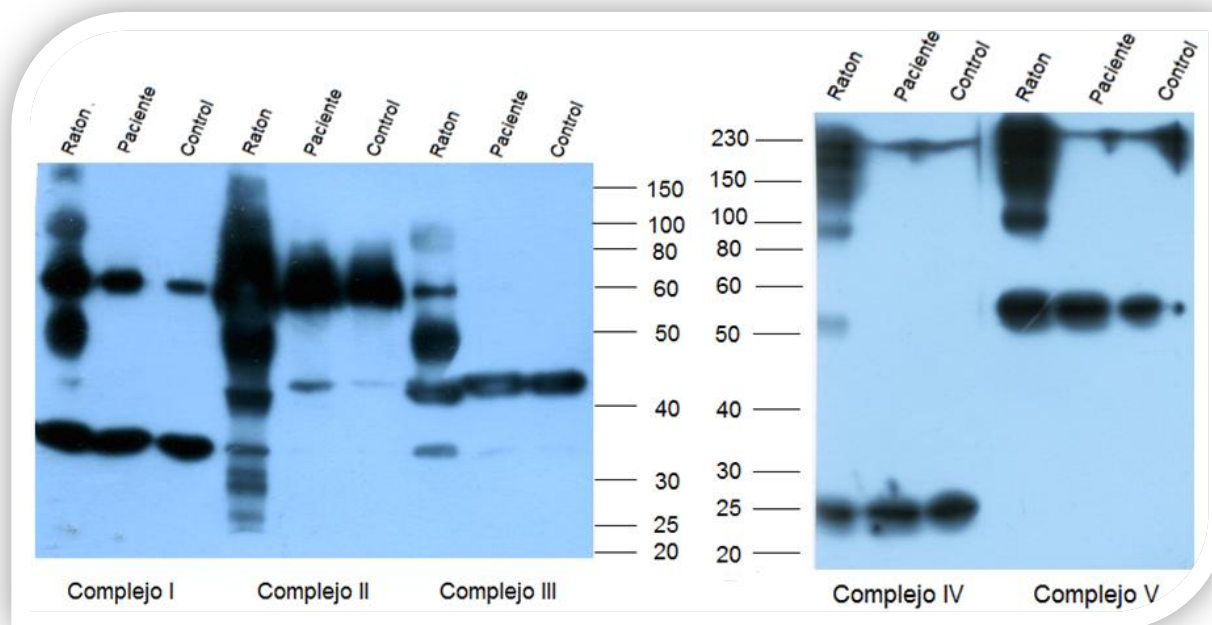


Figura 31: Subunidades mitocondriales derivadas de tejidos (solubilizados con LM) de paciente con probable mitocondriopatía y control detectadas por Western Blot en una electroforesis desnaturalizante.

Las bandas obtenidas en todos los carriles para cada complejo en el paciente muestran un perfil similar en comparación con el control, lo que sugiere que no hay una disminución en cuanto a cantidad de ningún complejo.

Posteriormente, se determinó la presencia de los complejos mediante WB en un gel nativo.

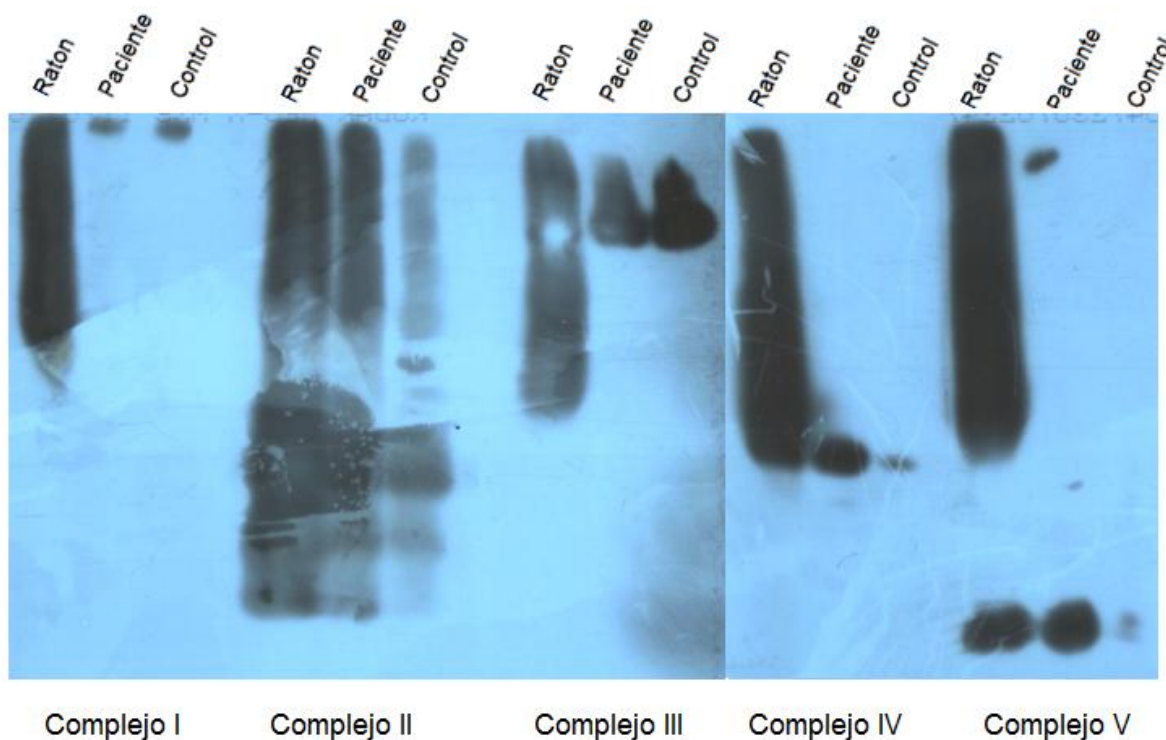


Figura 32: Subunidades mitocondriales derivadas de tejidos (solubilizados con LM) de paciente con probable mitocondriopatía y control detectadas por Western blot en una electroforesis nativa.

En la figura 32 se observa que la cantidad de los complejos IV y V del paciente se encuentran aumentados con respecto al control, ya que la intensidad de las bandas en los carriles del paciente para estos complejos es más intensa que el control. Sin embargo, el complejo V del paciente se encuentra disociado, ya que se observan dos bandas diferentes, lo cual indicaría que este complejo es inestable y fácilmente se disocia en sus dos subunidades, pudiendo ser que ésta inestabilidad lleve a su baja actividad y se refleje en el zimograma.

De los solubilizados con ambos detergentes se realizaron dobles dimensiones para después detectar las subunidades por WB.

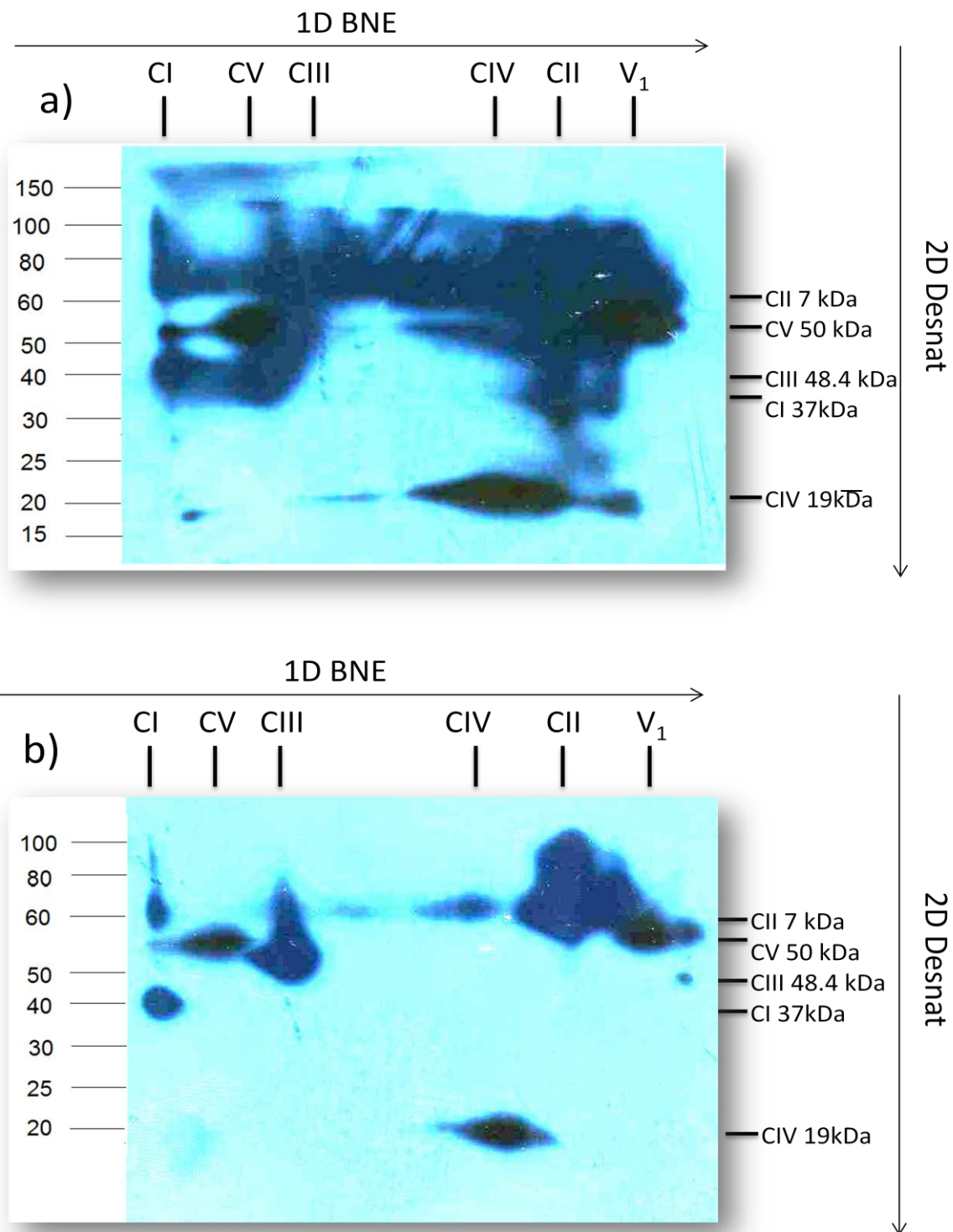


Figura 33: Subunidades mitocondriales de tejido humano solubilizado con LM detectadas por Western blot en una electroforesis 2D. a) Paciente b) control



Las líneas verticales que se encuentran en la parte superior de cada imagen muestran el orden de los complejos en la electroforesis nativa, como se observa, el perfil es el que siempre hemos visto en orden de izquierda a derecha de los complejos I, V, III, IV y II, y las líneas horizontales a la derecha de las imágenes muestran los pesos de cada subunidad reconocida por los anticuerpos, con lo cual encontramos al complejo I por ejemplo como el más pesado en la electroforesis nativa reconocido por un anticuerpo dirigido hacia una subunidad de 37 kDa en la electroforesis desnaturalizante.

Un supercomplejo se detecta al observar dos bandas diferentes en la misma posición vertical pero con pesos moleculares diferentes, si estos pesos corresponden a dos complejos diferentes entonces estaríamos viendo un supercomplejo de estos. Asimismo, bandas en la línea horizontal a la izquierda del complejo monomérico nos hablan de supercomplejos, como se observa en la figura 33, varias bandas horizontales a la izquierda del complejo IV a la misma altura.

Aunque sabemos que la digitonina separa principalmente supercomplejos, en la figura 34 vemos bandas correspondientes a complejos individuales en los solubilizados con digitonina y posibles asociaciones en los solubilizados con LM en la figura 33, esto ocurre ya que como bien se sabe en la literatura ambos detergentes tienen la capacidad de separar complejos monoméricos así como también supercomplejos, dependiendo de las condiciones a las que se utilicen.



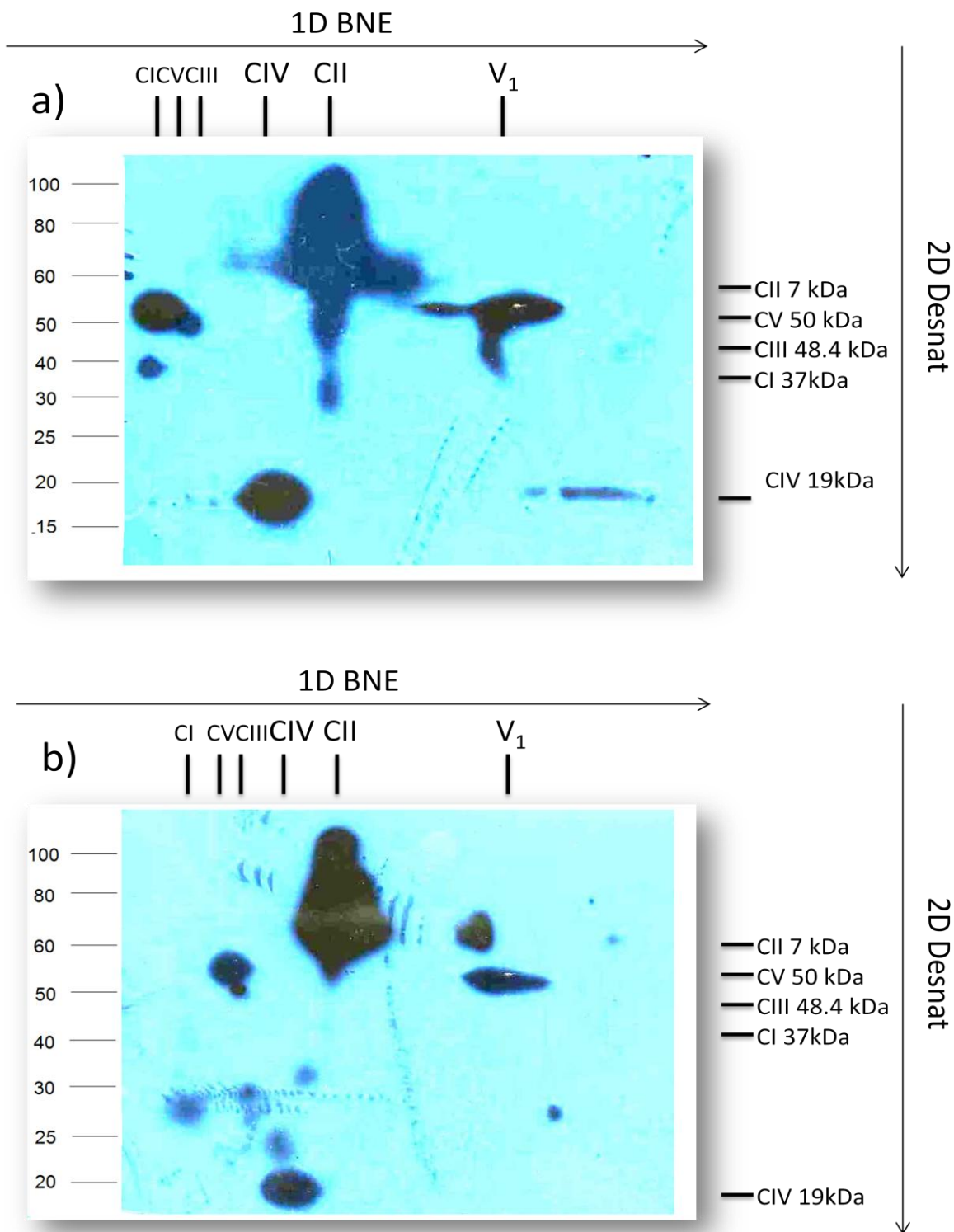


Figura 34: Subunidades mitocondriales de tejido humano solubilizado con digitonina detectadas por Western Blot en una electroforesis 2D. a) Paciente b) control.





En la figura 33 se observan asociaciones que no son fáciles de identificar, ya que, el gel no muestra una buena resolución y además las asociaciones no son tan obvias o por lo menos no es fácil asignarlas, lo que si podemos decir es que las subunidades de los complejos V, IV y II son evidentemente más intensas en el paciente.

En la figura 34 las bandas correspondientes a los complejos III, IV y V son más intensas en el paciente con respecto al control, el complejo I en el control no es evidente. Además en la posición que corresponde al complejo II se observa una banda grande que es más abundante y más intensa en el paciente.



6. DISCUSIÓN

Las mitocondriopatías son enfermedades complejas que afectan la función de los complejos de la cadena respiratoria. Desde hace una década se reconoció que estos complejos se encuentran asociados y forman supercomplejos o respirosomas, estas estructuras cumplen con varias funciones biológicas que se están determinando. En este trabajo se muestra la utilidad de las técnicas proteómicas para el diagnóstico y análisis de estas patologías.

En este caso se usaron varias técnicas electroforéticas para analizar el comportamiento de la OXPHOS y su papel en las mitocondriopatías, con el fin de determinar si el arreglo de estos complejos cumple un papel relevante en el desarrollo y aparición de estas enfermedades. Para hacer los experimentos se necesitó una biopsia de al menos 50 mg, ya que una menor cantidad no proporcionaba extractos suficientes para la realización de los ensayos; también se encontró que una vez solubilizadas, las mitocondrias no deben ser almacenadas durante un periodo mayor a dos semanas, ya que, aparentemente el detergente sigue actuando y afecta la integridad y actividad de los complejos, de manera que la actividad disminuye y aparecen bandas de actividad adicionales de menor tamaño. Esto altera el perfil de los zimogramas y requiere el uso de una mayor cantidad de proteínas. De igual forma es preferible usar biopsias frescas pues, las biopsias congeladas y almacenadas por más tiempo no mostraron el mismo rendimiento en cuanto a la obtención de solubilizados que las muestras frescas, ya que cuando se utiliza la misma cantidad de una biopsia siempre se obtuvo menor cantidad de proteínas, además se observó también un barrido (efecto de degradación parcial) en las electroforesis y en los zimogramas.

Aunque las técnicas utilizadas se describieron desde hace unos 10 años, se reconoce su poder como herramienta de análisis y diagnóstico de mitocondriopatías, pues han venido dando nueva información de varios aspectos técnicos y conceptuales que todavía no se conocen. En las electroforesis nativas se encontró que el perfil de bandas obtenido de las mitocondrias aisladas fue el mismo reportado en la literatura (Zerbetto et al, 1997) y es el típico de una solubilización con LM en un gel nativo, lo que corrobora la calidad de las preparaciones usadas.





A pesar de que en mitocondrias este perfil es fácilmente observable, en los extractos mitocondriales de tejido el perfil obtenido no muestra bandas tan obvias, por lo que hubo que asignar la identidad de las bandas por medio de los zimogramas y WB (*figuras 19, 29*).

Con los zimogramas se encontró que tanto en mitocondrias como en extractos mitocondriales es posible asignar la posición de cada complejo en el gel (Zerbetto et al, 1997), el complejo I se observa como una banda azul que indica la reducción del NBT, en la reacción del complejo V se observa una banda color blanco que nos indica la presencia del complejo V, esta banda se encuentra tal como ya se ha descrito (Wittig et al, 2007), por debajo del complejo I, esto ocurre así puesto que el complejo V se obtiene principalmente como monómero cuando se solubiliza con LM (Krause et al, 2005; Wittig et al, 2006), el cual es menos pesado que el complejo I. En todos los casos se comprobó que el gel nativo claro muestra varias ventajas respecto al gel nativo azul en la realización de estos ensayos, ya que, la reacción se lleva a cabo en un tiempo menor y la visualización de las reacciones colorimétricas es más definida debido a que no hay interferencia del color azul del gel (Wittig et al, 2007).

Al comparar la actividad de los complejos I, IV y V, en muestras de ratón y de humano se obtuvieron resultados similares por lo que la estandarización fue adecuada y los ensayos pudieron realizarse también en extractos mitocondriales de pacientes. Es interesante notar que entre los complejos de humano y ratón se ven algunas diferencias en la intensidad de las bandas de reacción colorimétricas, lo que muestra su capacidad para ver diferencias de actividad y su potencial como prueba diagnóstica. Para probar esta idea se usaron biopsias de pacientes con probable mitocondriopatía. Los resultados fueron confrontados con los obtenidos de la medición de actividad por espectrofotometría. Ya que la cantidad de biopsia proporcionada de los pacientes fue limitada y la obtención de mitocondrias se complica, usamos solo extractos mitocondriales enriquecidos para el análisis de este paciente.

De los cuatro pacientes analizados obtuvimos datos que correlacionaron con el ensayo catalítico por zimogramas. Solo uno de estos pacientes presentó diferencias y usamos la biopsia para analizarla. En los ensayos encontramos que el paciente presentaba una disminución en la actividad del complejo V con respecto al control, probablemente debido a un problema como la degradación o desestabilización del mismo.

El Western blot de una electroforesis desnaturalizante del paciente mostró que la cantidad de los complejos es similar en todas las preparaciones, no se observó alguna diferencia que pudiera sugerir





la disminución significativa de alguno de los complejos mitocondriales, ya que las bandas correspondientes a la inmunodetección de las subunidades de cada complejo son muy semejantes en las tres preparaciones utilizadas, en el complejo V se observa incluso una ligera disminución en el control, sin embargo, la mayor cantidad en el paciente sigue inactiva con lo cual suponemos que solo la actividad y no la cantidad del complejo V podría estar afectada, además este mismo resultado muestra que el complejo V es inestable, ya que se observaron dos bandas que pueden hablar de una disociación de este complejo, lo cual podría ser la causa de su baja actividad.

Esta biopsia también fue analizada para determinar la distribución de los supercomplejos. Es importante subrayar que antes de hacer los experimentos con el paciente se hicieron los análisis en controles y en ratón. Al realizar las solubilizaciones con digitonina y LM y separarlos por electroforesis nativa, encontramos claramente bandas correspondientes a supercomplejos en el caso de la digitonina y a complejos individuales en el caso del LM; esto se debe al hecho de que los supercomplejos son asociaciones de dos o más complejos con mayor peso molecular y en consecuencia los observamos por arriba de las bandas correspondientes a los complejos obtenidos con LM. También fue factible observar algunas posibles asociaciones que contenía la preparación, se observaron asociaciones entre los complejos I- III, I-IV y III-IV ya que estas bandas coincidieron a la misma distancia en ambos complejos. Sin embargo se necesita hacer más análisis, doble dimensión y WB para confirmar esta identidad.

Por otra parte es posible que con las condiciones utilizadas no se obtenga suficiente resolución pues no se encontraron todas las asociaciones que ya fueron reportadas (Eubel *et al*, 2004a, 2004b; Krause *et al*, 2004; Schägger 2002; Schägger & Pfeiffer 2000, Paumard *et al*, 2002), por lo que es necesario mejorar este aspecto.

Durante la estandarización de las dobles dimensiones encontramos que la tinción con las técnicas utilizadas presentaron diferencias en cuanto a la resolución observada. Aunque la tinción con Comassie muestra varias bandas, su intensidad no está muy definida lo cual dificulta mucho la visualización de las bandas separadas; para tratar de optimizar este problema se realizó también la tinción con plata, los geles teñidos de esta manera definen varias bandas que con Comassie no se distinguen, es decir con esta técnica se obtuvo una mejor resolución, aunque fue la tinción elegida para las dobles dimensiones, la tinción con plata tiene las desventajas de que es irreversible y no es





proporcional de tal manera que algunas bandas pueden sobre o subestimarse. Existen otros métodos más recientes que podrían ser utilizados para la tinción de los geles, tal es el caso del “deep purple”, el cual es un marcador fluorescente cuya sensibilidad puede detectar ng de proteína y que es muy usado en geles de 1 o 2 dimensiones (Bell 2003; Smejkal et al, 2004) y además es muy útil para la selección de bandas para la espectroscopía de masas (Heinemeyer et al, 2009).

En el caso del Western blot aplicado a estas dobles dimensiones se logró identificar cada uno de los complejos mitocondriales utilizando una mezcla de anticuerpos que reconocen una subunidad de cada complejo. Los resultados mostraron que las bandas se definían bien y no se empalmaban, comprobando así que es posible realizar Western Blot a dobles dimensiones para llevar a cabo la identificación de los supercomplejos.

La identificación de supercomplejos también se puede hacer por zimogramas, aunque es técnicamente un poco más complicado pues los geles no son un soporte fijo como las membranas (PVDF) usadas en el WB. Además la determinación de perfiles en dos dimensiones posibilita hacer el análisis sobre el contenido de subunidades y estequiometría de los complejos.

Cabe señalar que aun se deben optimizar varios aspectos del análisis, por una parte se debe establecer un control de carga que permita salvar las diferencias intrínsecas entre el contenido proteínico de las muestras, parte del problema se ha resuelto con la densitometría para tratar de igualar cantidades de proteínas, sin embargo, no se pudo saber si la actividad o intensidad de las bandas en un WB, estén afectadas por algo propio de la muestra y no con la cantidad de proteína utilizada. Esto resultó particularmente problemático en el caso del paciente pues al solubilizar con digitonina no se lograron observar supercomplejos, solo complejos individuales, con esto aún deben ajustarse los tiempos de solubilización y las cantidades de detergente, a pesar de esto la inmunodetección en las dobles dimensiones siempre reveló un aumento de los complejo IV y II principalmente, y revisando en la literatura, el aumento de este último puede ser factor de algunas otras patologías especialmente neoplásicas como el paraganglioma, leucoencefalopatía, etc. (Eng et al, 2003)

Aunque el caso del paciente no parece ser una mitocondriopatía clásica, es probable que si tenga un problema a nivel mitocondrial, pues la cantidad de algunos complejos se vio aumentada; así como la de supercomplejos. Aunque no pudimos verificar la presencia de supercomplejos ya reportados en la





literatura, encontramos que si ocurre la formación de estas estructuras, incluso, en el caso del complejo V, se ven bandas por debajo de su peso predicho, lo que muestra la degradación parcial y refleja una pérdida de estabilidad de este complejo, por lo cual la patología presente en este paciente podría estar asociada a ésta característica, a una inestabilidad de algunos complejos por una capacidad limitada para la formación de supercomplejos, como se nota una sobreexpresión de los complejos, podría estar ocurriendo un efecto compensatorio para equiparar la pérdida de actividad.





7. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos, las técnicas utilizadas permiten el análisis de muestras biológicas y por lo tanto pueden ser utilizadas en el diagnóstico.

Los zimogramas se pueden manejar como una herramienta en el diagnóstico de mitocondriopatías ya que permitieron evaluar funcionalmente los complejos respiratorios en estas patologías. Esta forma de evaluación es muy similar a la espectrofotometría donde por los defectos en la actividad, se determina la presencia o no de una mitocondriopatía. Sin embargo, este análisis se limita únicamente a la actividad pero, no dice mucho acerca del mecanismo molecular de estas enfermedades.

Por otra parte los análisis de inmunodetección por WB y las dobles dimensiones resultaron bastante útiles en el análisis estructural de los complejos respiratorios, ya que, permiten el análisis de los posibles ensamblajes entre los complejos para formar supercomplejos y además proporcionan información acerca de la estabilidad o inestabilidad que estos complejos pudieran presentar, estos experimentos brindan más información acerca de la patología y en este caso sí, sobre los mecanismos moleculares que subyacen estas enfermedades.

De esta manera vemos que en conjunto las técnicas utilizadas pueden ser muy útiles en el análisis y diagnóstico de enfermedades mitocondriales, además de que tiene un valor adicional, ya que, en el análisis ulterior por proteómica se tendrá un análisis más fino que, permitirá la mejor comprensión de estas enfermedades, dicha información podría ser útil en la valoración de marcadores biológicos y otras opciones de tratamiento, así como en el mecanismo molecular y celular afectado en estas enfermedades lo que permitirá un mejor diagnóstico y una mejor clasificación, lo que repercute en el mejoramiento de terapias y tratamientos a pacientes afectados.





8. ANEXO

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN ESPECTOFOTOMÉTRICA DE CUATRO PACIENTES CON POSIBLE MITOCONDRIOPATÍA

Nombre del paciente	Complejo I (NADH-DH)	Complejo II (Succinato-DH)	Complejos I+III (NADH- citocromo c reductasa) (sensible a rotenona)	Complejos II + III (Succinato cit. c reductasa)	Complejo IV (Cit. c oxidasa)	Citrato sintasa
Paciente 1	2.33	0.149	0.188 (0.068)	0.042	0.615	136
Paciente 2	1.96	0.094	0.159 (0.059)	0.007 Dismin. 65%	0.350	230
Paciente 3	1.86	0.138	0.361 (0.244)	0.018	0.276	145
Paciente 4	0.985	0.126	0.132 (0.056)	0.026	0.485	142
Rango de actividades nmol/min/mg proteína citrato sintasa	1.00 - 6.50	0.035 - 0.250	0.170 - 0.600 (0.025 - 0.234)	0.020 - 0.150	0.150-0.500	80 - 200

1. Actividad de CR normal
2. Los resultados sugieren deficiencia de la CoQ10 analizados por las relaciones: Complejos I+III y Complejos II +III
3. Actividad de CR normal
4. Actividad de CR normal





9. REFERENCIAS

- Acin R, Bayona M, Fernandez P, Moreno R, Perez A, Bruno C, Moraes T, Enriquez A.** (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol. Cell.* 13: 805–815.
- Anderson S, Bankier A, Barrell B, de Buijn M, Coulson A, Drouin J, Eperon I, Ierlich D, Roe B, Sanger F, Schreir P, Smith A, Staden R, Young I.** (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* **290**:457-465.
- Bell P.J, Karuso P,** (2003) Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum* of *Giardia* cysts. *J Microbiol Methods* 52:133-135.
- Calvaruso MA, Smeitink J, Nijtmans L.** (2008) Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation. *Methods (San Diego, Calif.).* 46(4):281-7.
- Cao, Z., Wanagat, J., McKiernan, S.H., Aiken, J.M.** (2001). Mitochondrial DNA deletion mutations are concomitant with ragged red regions of individual, aged muscle fibers: analysis by laser-capture microdissection. *NucleicAcids Res.* 29, 4502–4508
- Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE.** (2003) Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics.* 2: 117-126.
- Chan D.C.** (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell.* 125:1241–1252.
- Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C, Attardi G.** (1992) MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 4221-4225.
- Cruciat CM., Brunner S., Baumann F., Neupert W., Stuart R.A.,** (2000) The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* 275: 18093–18098.
- D'Aurelio M, Gajewski CD, Lenaz G, Manfredi G.** (2006) Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Human molecular genetics.* 15(13):2157-69.





- Diaz F, Fukui H, Garcia S, Moraes C.** (2006) Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 26:4872–4881
- DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Servidei S, De Vivo DC, Schon EA.** (1987) Mitochondrial myopathies. *J Inher Metab Dis.* 10: 113-128.
- Donald Voet, Judith G. Voet,** (2006) “ Bioquímica” edit. Medica Panamericana
- Dudkina N.V, Sunderhaus S, Braun H.P, Boekema E.J.** (2006) Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria, *FEBS Lett.* 580: 3427–3432.
- Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen L a.** (2003) A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nature reviews. Cancer.* 3(3):193-202.
- Engel, W.K., Cunningham, G.G.,** (1963). Rapid examination of muscle Tissue. An improved trichrome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* 13, 919–923.
- Eubel H, Heinemeyer J, Braun P.** (2004a) Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol.* 134:1450–1459. 17
- Eubel H, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Braun H.** (2004b). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* 42:937–942.
- Eubel H. Jansch L. Braun H.** (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II, *Plant Physiol* 133; 274-286.
- Gilkerson RW, Selker JM, y Capaldi R.** (2003) The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS lett.* 546: 355-358.
- Gómez L a, Monette JS, Chavez JD, Maier CS, Hagen TM.** (2009) Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart. *Archives of biochemistry and biophysics.* 490(1):30-5.
- Hackenbrock, C. R., Chazotte, B., and Gupte, S.S.** (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18; 331-368.
- Hatefi Y.,** (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system, *Annu. Rev. Biochem.* 54: 1015–1069.





- Heinemeyer J, Scheibe B, Schmitz UK, Braun H-P.** (2009) Blue native DIGE as a tool for comparative analyses of protein complexes. *Journal of proteomics*. 72(3):539-44.
- Vonck J, Schäfer E.** (2009) Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochimica et biophysica acta*. 1793(1):117-24.
- King MP, Koga Y, Davidson M, Shon EA.** (1992) Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the Trna (Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Mol Cell Biol*. 12: 480-490.
- Krause F, Reifschneider N, Vocke D, Seelert H, Rexroth S, Dencher N.** (2004) Respirasome-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *J. Biol. Chem*. 279: 48369–48375.
- Krause F, Reifschneider N.H, Goto S, Dencher N.A.** (2005) Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 329: 583-590.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): p. 680-5.
- Lenaz G, Genova M.** (2007) Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: Random collisions versus solid state electron channeling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 292: 1221–1239.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- Minauro-Sanmiguel F, Wilkens S, GarciaJ.J.** (2005) Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102; 12356–12358.
- Pakendorf, B. & Stoneking, M.** (2005). "Mitochondrial DNA and human evolution". *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 6: 165-83.
- Paumard P, Vaillier J, Coulary B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller D, Bréthes D, di Rago JP, y Velours J.** (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondria cristae morphology. *EMBO J*. 21:221-30.





- Pozzan T, Magalhaes P, Rizzuto R.** (2000) The comeback of mitochondria to calcium signalling, *Cell Calcium* 28: 279–283.
- Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N. H., Krause, F., Dencher, N. A., Vonck, J.** (2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem.* 281; 15370-15375.
- Schagger H, Cramer W.A, Von Jagow G.** (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two- dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220-230.
- Schägger H, Pfeiffer K.** (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *The Journal of biological chemistry.* 276(41):37861-7.
- Schägger H, Pfeiffer, K.** (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19: 1777–1783.
- Schägger H.** (2001). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life.* 52:119–128.
- Schägger H.** (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1555:154–159.
- Sharma L, Lu J, Bai Y.** (2009) Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Current Medicinal Chemistry.* 16:1266-1277
- Shoubridge E a.** (2001) Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Human molecular genetics.* 10(20):2277-84.
- Smejkal G.B, Robinsosn N.H, Lazarev A.** (2004) Comparison of fluorescent stains: relative photostability and differential staining of proteins in two-dimensional gels, *Electrophoresis* 25:2511-2519
- Smet J, De Paepe B, Seneca S, et al.** (2011) Complex III staining in blue native polyacrylamide gels. *Journal of inherited metabolic disease.* 34(3):741-7.
- Tamara D, González R.** (2004) Hospital Infantil Sur LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES: UN RETO PARA LAS CIENCIAS MÉDICAS. *Neuromuscular Disorders;* 8(1).
- Thorburn D. R, Chow C. W, Kirby D. M.** (2004) Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver. *Mitochondrion.* 4: 363-375





- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 76: 4350-4
- Wallace D.** (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 283:1482-8
- Wallace D.** (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39: 359-407.
- Willis JH, Capaldi R a, Huigsloot M, et al.** (2009) Isolated deficiencies of OXPHOS complexes I and IV are identified accurately and quickly by simple enzyme activity immunocapture assays. *Biochimica et biophysica acta.* 2009;1787(5):533-8.
- Wittig I, Braun HP, Schagger H.** (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc.* 1: 418-428
- Wittig I, Carrozzo R, Santorelli F, Schagger H.** (2007) Functional assays in high resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* 28: 3811–3820.
- Wittig I, Carrozzo R, Santorelli FM, Schagger H.** (2006) Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta.* 1757(9-10):1066-72.
- Wittig I, Schagger H.** (2009) Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochimica et biophysica acta.* 1787(6):672-80.
- Wittig J. and Schagger H.** (2005) Advantages and limitations of clear native polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics.* 5, 4338-4346.
- Zerbetto E, Vergani L, Dabbeni-Sala F.** (1997) Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 18(11):2059-64.
- Zeviani M, Di Donato S.** (2004) Mitochondrial disorders. *Brain : a journal of neurology.* 127(Pt 10):2153-72

