



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi del coenzim Q₁₀ en pacients neuropediàtrics; avenços diagnòstics i identificació de noves causes d'alteracions secundàries

Dèlia Yubero Siles

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



HOSPITAL MATERNOINFANTIL
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**Estudi del coenzim Q₁₀ en pacients neuropediàtrics;
avenços diagnòstics i identificació de noves causes
d'alteracions secundàries**

Dèlia Yubero Siles

2016

Estudi del coenzim Q₁₀ en pacients neuropediàtrics; avenços diagnòstics i identificació de noves causes d'alteracions secundàries

Memòria presentada per

Dèlia Yubero Siles

per optar al grau de

Doctora

per la Universitat de Barcelona

Programa de Genètica, Departament de Genètica
Facultat de Biologia

Tesi realitzada sota la direcció

del **Dr. Rafael Artuch Iriberry** i de la **Dra. Raquel Montero Sánchez**

A l'Hospital Sant Joan de Déu

Rafael Artuch Iriberry

Raquel Montero Sánchez

Gemma Marfany Nadal

Dèlia Yubero Siles

Barcelona, març de 2016

Al meu pare

A la meva mare

A la meva àvia

The mismeasure of man

Dèlia Yubero Siles*

*c/Til·lers, 1. 08348. Cabrils. Barcelona. Espanya. **Terra**, Tercer de Sol. Núvol interestelar Local, Bombolla Local, Cinturó de Gould, Braç d'Orió. Via Làctia, Grup Local, Supercúmulo de Verge. **Univers Local**, temps present.

Introducció: Necessitem energia. Per absolutament tot el que fem. Tan importants són els substrats que utilitzem com les formes de processar aquesta energia. Corrent el risc que us rigueu de mi, plantejaré una idea: si jo fos un mitocondri de mida aberrant i desmesurada, heu de saber que – espero no ofendre a ningú– vosaltres serieu els meus CoQ₁₀. Tindria diversos *pools* de CoQ₁₀ representant diferents ambients socials que, en trobar-me amb ells, m'ajudarien a produir l'energia que em cal. De vegades, pel que sigui, hi hauria desajustos i només podria anar amb uns *pools* determinats, sense rebre notícies dels demés. I jo, tossuda, sempre buscant l'equilibri adequat.

Resultats i discussió

Voldria agrair principalment a *l'Institut de Salud Carlos III* pels projectes FIS i associats concedits, a FEDER i al CIBERER, pels quals he pogut treballar al grup de metabòliques de l'Hospital Sant Joan de Déu. També als pacients i les seves famílies, les associacions de pares de pacients amb MPS, de pacients mitocondrials (AEPMI), i al nou Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu (IRP-HSJD), sense els que la recerca no seria igual. I sens dubte a l'espectacular fauna del laboratori de metabolopaties [1, 13], a les perles de genètica [2, 3], a les persones del laboratori en general i tots els especialistes en malalties neuropediàtriques [4] que ens ajuden diàriament a ser una mica més grans, així com a aquells que ens recolzen en la distància [5].

No sóc partidària dels excessos, molt menys dels de paraules, però probablement hagi de fer un esforç per expressar allò que protegeixo i mai deixo sortir. Fa un temps no era més que una petita *Homo insàpiens insàpiens* (*Microcosmos*, Lynn Margulis & Dorion Sagan) moguda per la por, creient que aquest primer enemic de l'home m'havia vençut (*Las enseñanzas de Don Juan*, Carlos Castaneda). Desitjava avançar sense deixar-me veure, mentre m'allunyava cap aquella cabanya a la llacuna de Walden (*Walden*, Henry David Thoreau), on m'asseguraria dosis reduïdes de contacte humà. El que més por em feia tornava a mi una vegada i una altra, en una mena d'etern retorn (*La insoportable levedad del ser*, Milan Kundera), afavorint la construcció d'una cuirassa impenetrable gradualment més i més dura. Però com sempre passa, mai res és tan dramàtic com els nostres mecanismes d'alarma ens fan creure. Vaig assolir un estat contemplatiu que consistia en asseure's en una pedra –en el meu cas era pujar a dalt d'una olivera– per observar el moviment del món, sense ser-ne part (*Siddharta*, Hermann Hesse).

Però ens hi resistim o no, som part de l'entorn que ens envolta, aportem energia per a que funcioni. Totes les persones amb les que topem ens produeixen un impacte, sigui negatiu, sigui positiu, petit o immens; al final tot es converteix en quelcom que formarà part de nosaltres, ja que som les nostres bases però també som les modificacions que els demés ens produeixen. Tot i haver tingut sempre la sensació de no formar part d'enlloc, possiblement aquests últims anys són en els que més acollida i estimada m'he sentit: pels que em van obrir al món (per molt lluny que estigues [6]), pels que em varen ensenyar (sobretot a empenyar el carro [2]), pels que em van inspirar (*Teatro mágico. No se permite la entrada a todo el mundo. ¡Solo para locos!* [7]) i il·lusionar (MAPlab, sou genials i us trobo a faltar [8]), pels que em fan somriure (els meus aikidoques [9] i *tomodachis* [1-11, 13]) i pels que m'han ajudat a créixer (genis de la cromatografia i grans experts en l'apassionant món del metabolisme [1, 13]). Evidentment, també pels que sempre hi són (els meus pares i el meu germà, la meua família [11]). Heu de saber que cadascun de vosaltres m'ha donat quelcom únic i intransferible. Sou especials; trobar-vos a tots ha estat un veritable plaer.

M'he fet més gran i més forta, sense distanciar-me del que sóc. A més, m'encanta que em doneu guerra; és matèria de transformació. Ningú serà capaç de rectificar les línies de les meves mans, ni ho pretendré a la inversa. Tal com explica Morihei Ueshiba, el fundador de l'Aikido, a través del concepte japonès *masakatsu agatsu*, no existeix competició, ja que l'autèntica victòria és la victòria sobre un mateix.

<<A pesar de lo rápido que me pueda atacar el enemigo, nunca soy vencido, pero no es porque mi técnica sea más rápida que la suya; no es una cuestión de rapidez, si no de que la lucha ha terminado antes de comenzar>> [12]

Gran part del meu esforç sorgeix de la motivació que m'inspira la persona que és el motor del laboratori de metabolopaties [13]. No puc més que donar tot el que tinc a algú tan excepcional com ell. En aquest món descomunal, ple de monstres de paper, on ningú escolta la meua veu, on percebo la meua fragilitat; m'has ajudat a entrar, sense por. Gràcies Rafa.

Agraïments

El títol d'aquest escrit fa referència al llibre del paleontòleg Stephen Jay Gould. Per elaborar la portada s'han utilitzat petits fragments de la obra de *pezdetierra*.

Bibliografia

Cada referència conté noms en ordre aleatori; l'autor no es fa responsable de malentesos derivats. Hi ha cites amagades al text que no han estat referenciades a ningú, per tant queden per l'imaginari individual.

- [1] Batllori, Molero, Aida, Cristina, Laura, Raquel, Juan, Aroa, Yahel, Mercedes, Tania, Montserrat, Rosa Maria, Mireia
- [2] Judith i Edgar
- [3] Núria, Silvia, Laura, Paola, Esther
- [4] Mar, Fede, Àngels i els demés *mitofreaks*
- [5] Julio, Claudio, Plácido, Iain, Edu, Carmina
- [6] Pira, Adri, Amor, María i el petit Héctor
- [7] Daroqui
- [8] Elvira, Quim, Marta, Yaiza, Llorenç, Sergi, Mar, Berta, Raquel, Sara, Berta, Mireia, Mònica, Miquel Àngel, Víctor, Anna
- [9] Xavi, David, Andrea, Llorenç, Sergi i els mini-aikidoques Nil, Biel, Dídac, Jorja
- [10] Alba, Maryam, Ester, Irene, Eva
- [11] Tomàs, Carmen, Denís, Pili, Carme, Carla, Edda, Dario, Mariflor, Emi, Lola, Ana, Paco, Efrem, Celia
- [12] Morihei Ueshiba, *El arte de la Paz*
- [13] Rafael Artuch

La eternidad y el infinito se hallan demasiado lejos del patrón inevitable de nuestros propios cuerpos para conseguir nuestra comprensión; pero la continuidad de la vida se sitúa directamente en el borde externo de la fascinación última: lo bastante cerca para la inteligibilidad mediante la medida de nuestro tamaño corporal y nuestro tiempo terrenal, pero suficientemente lejos para inspirar el máximo asombro.

STEPHEN JAY GOULD, *Acabo de llegar*

Agraïments

ABREVIATURES **17**

INTRODUCCIÓ **21**

1. El coenzim Q₁₀ 21

1.1. Característiques principals 21

1.2. Síntesi endògena i incorporació exògena 22

1.3. Funcions essencials 26

2. Deficiències de coenzim Q₁₀ en patologia humana 29

2.1. Aspectes clínics 29

2.2. Deficiències primàries i secundàries 31

2.3. Fisiopatologia de les deficiències de coenzim Q₁₀ 37

3. Diagnòstic de les deficiències de coenzim Q₁₀ 38

3.1. Diagnòstic bioquímic 38

3.1.1. Plasma 39

3.1.2. Múscul 39

3.1.3. Fibroblasts 41

3.1.4. Líquid cefaloraquidi 42

3.1.5. Altres 42

3.2. Diagnòstic genètic 42

JUSTIFICACIÓ DE LA UNITAT TEMÀTICA **47**

OBJECTIUS **51**

RESULTATS **55**

Informe dels directors 55

CAPÍTOL 1 61

Publicació 1:	63
<i>Secondary coenzim Q₁₀ deficiències in mitochondrial and non-mitochondrial diseases</i>	65
CAPÍTOL 2	79
Publicació 2:	81
<i>Severe encephalopathy associated to pyruvate dehydrogenase mutations and unbalanced coenzyme Q₁₀ content</i>	83
Publicació 3:	89
<i>Association between coenzyme Q₁₀ and glucose transporter (GLUT1) deficiency</i>	91
Publicació 4:	97
<i>Coenzyme Q₁₀ and pyridoxal phosphate deficiency is a common feature in Mucopolysaccharidosis Type III</i>	99
CAPÍTOL 3	109
Publicació 5:	111
<i>Determination of urinary coenzyme Q₁₀ by HPLC with electrochemical detection: reference values for a paediatric population</i>	113
Publicació 6:	121
<i>A statistical algorithm showing Coenzyme Q₁₀ and Citrate Synthase as biomarkers of mitochondrial activity</i>	123
<u>DISCUSSIÓ</u>	131
1. Estudi de l'estat del coenzim Q ₁₀ en una cohort gran de pacients amb diagnòstic molecular definitiu	132
2. Identificació de noves causes d'alteracions de l'estat del coenzim Q ₁₀ , plantejant aspectes fisiopatològics i terapèutics	137
2.1. Deficiència de piruvat deshidrogenasa	137
2.2. Deficiència del transportador de glucosa GLUT1 al cervell	138

2.3. Malalties lisosomals: malaltia de SanFilippo (mucopolisacaridosi tipus III)	140
3. Implementar avenços metodològics pel diagnòstic o seguiment de pacients amb deficiències de coenzim Q ₁₀ i malalties mitocondrials	143
3.1. Anàlisi del coenzim Q ₁₀ en mostres d'orina	144
3.2. Desenvolupament i aplicació d'un algoritme matemàtic per la interpretació dels valors del coenzim Q ₁₀ , citrat sintasa i activitats de la cadena respiratòria mitocondrial	146
4. Perspectives diagnòstiques	150
<u>CONCLUSIONS</u>	153
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	157
<u>ANNEX</u>	181
Algoritme diagnòstic	181
Altres publicacions	183

ABREVIATURES

ATP	adenosina trifosfat
CI	complex I; NADH:ubiquinona oxido-reductasa
CII	complex II; succinat:ubiquinona oxido-reductasa
CIII	complex III; ubiquinol:citocrom c oxido-reductasa
CIV	complex IV; citocrom c oxidasa
CV	ATP sintetasa
CoQ₁₀	coenzim Q ₁₀ (ubiquinona)
CoQ₁₀H[•]	coenzim Q ₁₀ (semiubiquinona)
CoQ₁₀H₂	coenzim Q ₁₀ (ubiquinol)
CRM	cadena respiratòria mitocondrial
CS	citrat sintasa
DNA	àcid desoxiribonucleic
G1DS	síndrome de deficiència del transportador GLUT1
HPLC	cromatografia líquida d'alta precisió
LCR	líquid cefaloraquidi
MMI	membrana mitocondrial interna
MPS	mucopolisacaridosi
mtDNA	DNA mitocondrial
NGS	seqüenciació massiva
OXPHOS	sistema de fosforilació oxidativa mitocondrial
PDH	piruvat deshidrogenasa
PLP	piridoxal fosfat
ROS	espècies reactives de l'oxigen
SCs	supercomplexes de la CRM
SNC	sistema nerviós central

INTRODUCCIÓ

1. COENZIM Q₁₀

1.1 Característiques principals

El sistema més efectiu de producció d'energia cel·lular és la fosforilació oxidativa mitocondrial (OXPHOS), en la qual una sèrie de components situats a la membrana mitocondrial interna bombegen protons de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana, amb l'objectiu de generar un gradient protònic que s'utilitza per sintetitzar adenosina trifosfat (ATP). Un dels participants d'aquest procés és el coenzim Q₁₀ (CoQ₁₀), un lípid amb capacitat redox que funciona com a transportador d'electrons a la cadena respiratòria mitocondrial (CRM). El seu rol és clau, ja que una deficiència de la molècula de CoQ₁₀ impedirà el correcte funcionament de la CRM, produint un desequilibri del metabolisme energètic cel·lular. L'alteració del sistema d'OXPHOS per manca de CoQ₁₀ es manifestarà com una afectació de diversos òrgans i teixits a diferents graus, que és el que es coneix com a síndrome de deficiència de CoQ₁₀.

El CoQ₁₀ fou descobert l'any 1957 per Crane i posteriorment caracteritzat per Folkers i col·laboradors (Crane et al., 1957; Folkers et al., 1969). El trobem a les membranes cel·lulars de totes les cèl·lules eucariotes (Crane, 2007; Sastry et al., 1961), així com en les lipoproteïnes plasmàtiques. Concretament es localitza a les membranes de molts orgànuls (reticle endoplasmàtic, peroxisomes, lisosomes, vesícules), tot i que als mitocondris és on hi ha les concentracions més altes. La seva presència a l'organisme depèn principalment de la via de síntesi endògena i en menor mesura de la incorporació exògena a través de la dieta (Crane & Navas, 1997). Històricament, la primera deficiència bioquímica de CoQ₁₀ fou descrita per Ogasahara uns 30 anys més tard de la caracterització de la molècula, en dues pacients amb un fenotip neuromuscular (Ogasahara et al., 1989). Des de llavors, nombrosos fenotips s'han descrit a mesura que han sorgit nous pacients, a l'hora que s'han anat descobrint les nombroses funcions en les quals intervé (Bentinger et al., 2010). D'altra banda, s'han observat alteracions del l'estat del CoQ₁₀ en moltes malalties freqüents com el càncer, la diabetis mellitus, malalties cardiovasculars i neurodegeneratives, així com en processos d'envelliment (Dhanasekaran & Ren, 2005), que no són objecte d'estudi de la present tesi doctoral. El major interès en la recerca ve impulsat per la eficàcia que ha demostrat

el CoQ₁₀ com a tractament, especialment en pacients amb deficiències bioquímiques d'aquesta molècula, ja que s'han evidenciat millores notables en els signes clínics després de períodes de suplementació. Conseqüentment, un dels objectius en aquest projecte de llarga trajectòria ha estat impulsar la recerca per tal de millorar el diagnòstic i coneixement de les deficiències de CoQ₁₀.

1.2 Síntesi endògena i incorporació exògena

La molècula de CoQ₁₀ humana la forma un anell benzoquinona unit a una cadena de 10 unitats isoprèniques (Figura 1). A les membranes cel·lulars, les propietats lipofíliques de la cadena d'isoprenoides fan que se situï en la part més hidrofòbica de la bicapa lipídica, tot i que l'anell quinona es troba més pròxim a la fase hidrofílica de la bicapa. És la capacitat redox proporcionada per la benzoquinona el que li atribueix al CoQ₁₀ la funció de transportador d'electrons i fa que actuï com un important antioxidant de producció endògena.

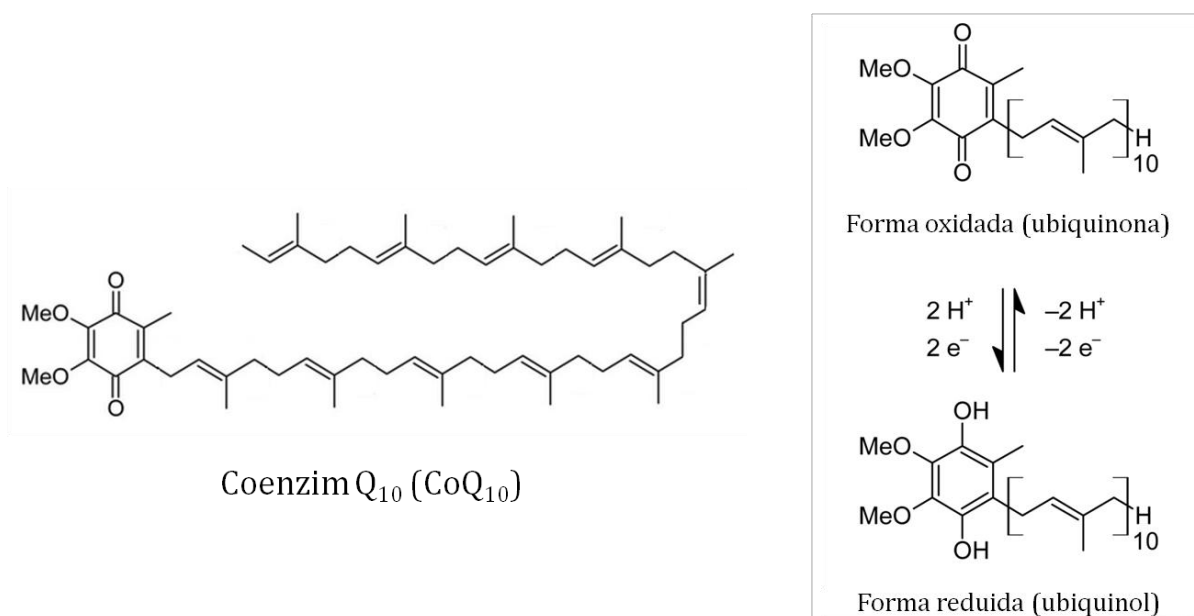


Figura 1. Estructura i transicions redox del CoQ₁₀. La molècula de CoQ₁₀ humana està formada per un anell benzoquinona i una cadena de 10 unitats isoprenoides. El CoQ₁₀ existeix en tres formes intercanviables d'oxidació: la forma completament reduïda (ubiquinol), l'intermediari semiquinona i la forma completament oxidada (ubiquinona). *Modificat d'Ali et al., 2010.*

Totes les cèl·lules de l'organisme sintetitzen CoQ₁₀ per una ruta biosintètica complexa, la qual consta de tres blocs principals (Figures 2A i 2B). Dues vies independents inicien el procés amb la síntesi dels dos components que formaran part del CoQ₁₀, l'anell benzoquinona i la cadena d'isoprenoides. D'una banda, a partir de l'aminoàcid tirosina es genera el 4-OHbenzoat, el precursor de la 1,4-benzoquinona; de l'altra, la cadena d'isoprenoides prové de l'acetil CoA per la via del mevalonat, la qual és comú a la síntesi d'altres lípids com el dolicol i el colesterol (Ernster et al., 1995) (Figura 2A). L'inici de la via específica de síntesi del CoQ₁₀ succeeix amb la condensació del 4-OHbenzoat amb el decaprenil-PP, formant decaprenil-4-OHbenzoat. A continuació esdevenen una sèrie de reaccions de metilació, descarboxilació i hidroxilació que modifiquen la quinona fins la formació de la molècula de CoQ₁₀ (Figura 2B). En mamífers, el procés ocorre gràcies a la presència d'un complex d'estructura similar al que s'ha observat en llevat (Ashraf et al., 2013), en el qual les proteïnes denominades COQ (específiques de la síntesi del CoQ₁₀) s'agruparien en un complex multiproteic el centre del qual seria la proteïna COQ4, si bé no es coneix exactament la composició i organització d'aquest complex. La via de síntesi té lloc al mitocondri, ja que la majoria de proteïnes COQ en mamífers no mostren localització extramitocondrial. Malauradament, es coneix tant poc del tràfic intracel·lular del CoQ₁₀ com de la regulació del procés biosintètic. Sembla que certs poli-isoprenoides, tocotrienols, la vitamina K₂ i el propi CoQ₁₀ actuen com a reguladors biològics de la via del mevalonat, incrementant la síntesi del CoQ₁₀ i inhibint la del colesterol (Bentinger et al., 2008).

Es coneixen tretze gens específics per la biosíntesi del CoQ₁₀ (*PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ3*, *COQ4*, *COQ5*, *COQ6*, *COQ7*, *ADCK3*, *ADCK4*, *COQ9*, *COQ10A*, *COQ10B*) (Salviati et al., 2012), així com també participen gens que no són exclusius d'aquesta via (*FDX1L*, *FDXR*) (Desbats et al., 2015). La incògnita respecte la funció exacta de certes proteïnes implicades en el procés denota la complexitat de la via biosintètica. Per exemple, s'han descobert tres gens més (*ADCK1*, *ADCK2*, i *ADCK5*) dels quals es desconeix el seu rol i no existeixen proves experimentals de la seva participació a la síntesi del CoQ₁₀. És més, molts enzims que catalitzen passos enzimàtics específics no han estat encara caracteritzats ni tan sols en organismes més simples.

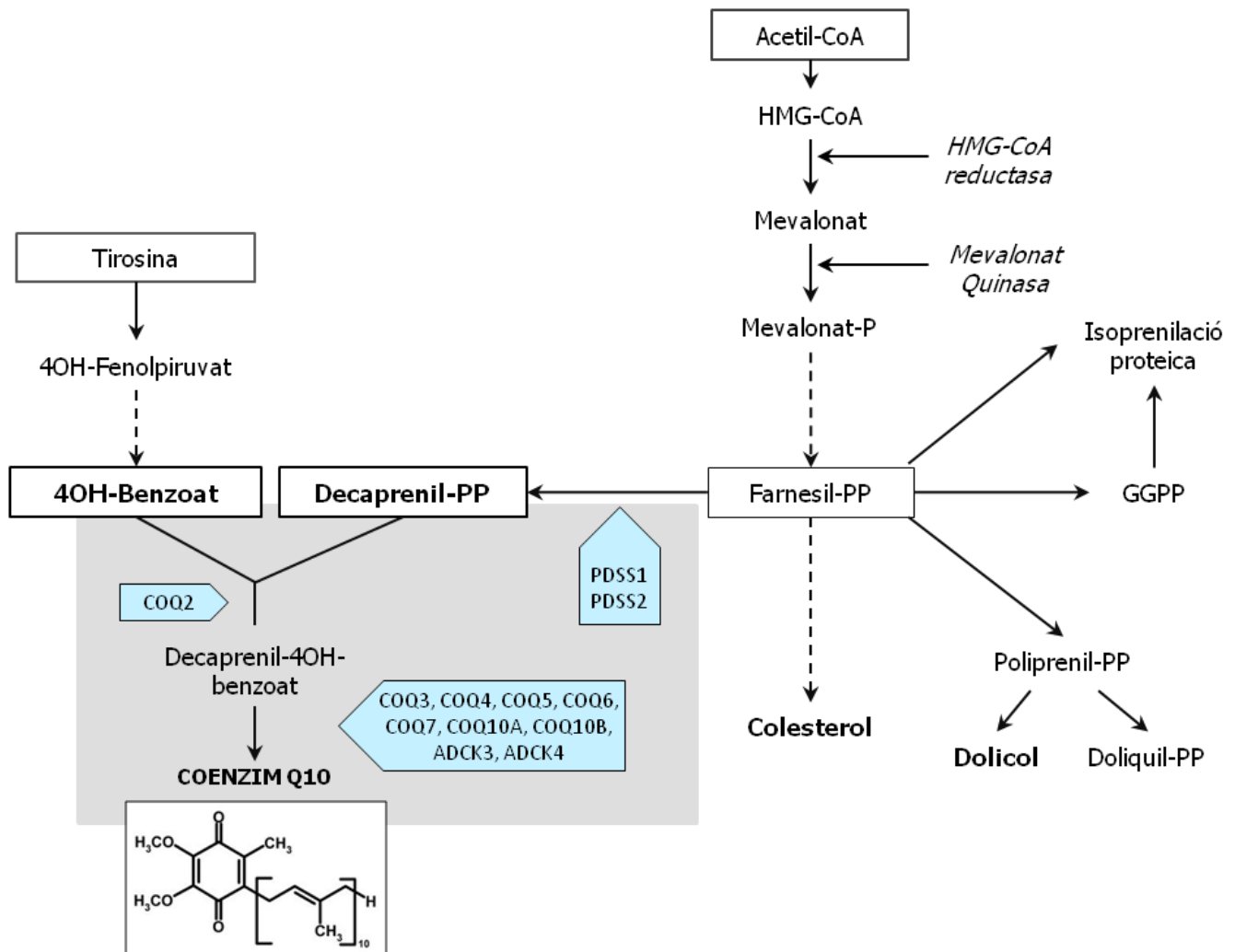


Figura 2A. Representació esquemàtica de la síntesi del CoQ₁₀ on es mostren les 3 parts principals. Per una banda, la tirosina és el precursor del 4OH-benzoat (anell benzoquinona). Per l'altra, l'acetil-CoA proporciona la cadena d'isoprenoides a través de la via del mevalonat, comú per la síntesi d'altres lípids com el dolicol i el colesterol. La zona emmarcada en gris mostra la part específica, on intervien les proteïnes COQ. Primer, s'allarga la cadena d'isoprenoides a 10 per formar el decaprenil pirofosfat (decaprenil-PP). Després succeeix la condensació del 4OH-benzoat i amb el decaprenil-PP. I, finalment, ocorren una sèrie de reaccions de modificació de l'anell que acaben en la formació de la molècula de CoQ₁₀.

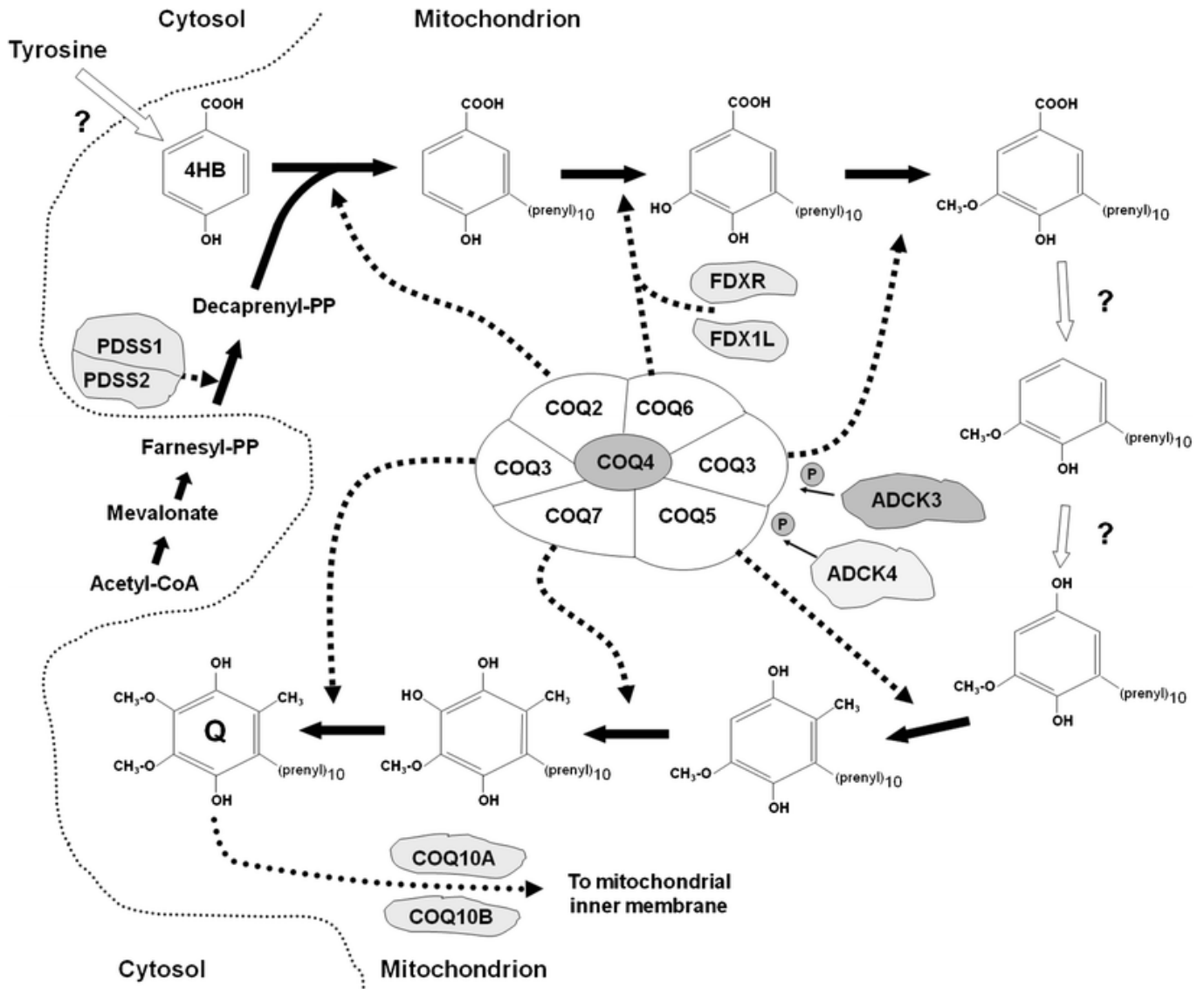


Figura 2B. Representació de la via específica del CoQ₁₀. De la tirosina deriva el 4OH-benzoat (4HB) a través de reaccions no caracteritzades. A l'hora, la porció lipídica és produïda al citosol per la via del mevalonat i al mitocondri per l'acció de PDSS1 i PDSS2. La resta de reaccions succeeix a nivell mitocondrial, on la resta d'enzims biosintètics s'agrupen en un complex organitzat per COQ4: COQ2, COQ3, COQ5, COQ6 i COQ7. ADCK3 i ADCK4 aparentment s'associen al complex, però es desconeix la seva funció exacta. D'altra banda, FDX1L i FDX1R proveeixen d'electrons a COQ6, però són proteïnes que també participen en altres vies. Les fletxes blanques i signes d'interrogació mostren els passos que encara no han estat caracteritzats experimentalment. Finalment, COQ10A i COQ10B actuen com a xaperones necessàries per la localització del CoQ₁₀ a la MMI. *Imatge obtinguda de Desbats et al., 2015.*

Encara que la síntesi endògena contribueix a la major part del CoQ₁₀ cel·lular, aquest també s'obté de diverses fonts alimentàries. Així mateix, és absorbit per l'intestí mitjà a través de mecanismes parcialment coneguts en els que possiblement intervinguin transports actius i passius (Palamakula et al., 2005) i, degut a la seva inherent hidrofobicitat, el primer pas en la captació del CoQ₁₀ consisteix en la incorporació als quilomicrons. El destí principal d'aquest CoQ₁₀ és el fetge, que el distribuirà al torrent sanguini vinculat a les lipoproteïnes plasmàtiques, on es troba quasi totalment associat a aquestes (Miles et al., 2007). Ara bé, tots els teixits i cèl·lules són capaços de sintetitzar les quantitats adequades i suficients de CoQ₁₀ per realitzar les funcions bàsiques per les que és imprescindible; i de forma fisiològica no hi ha una captació rellevant del CoQ₁₀ sanguini als teixits (Elmberger et al., 1987). Tanmateix, diversos estudis en models animals i humans assenyalen que el CoQ₁₀ exogen podria ser transportat i incorporat als teixits perifèrics, segons la farmacocinètica de les diverses formulacions de CoQ₁₀, les dosis subministrades i la durada de la subministració (Miles et al., 2007).

1.3 Funcions essencials

El CoQ₁₀ existeix en tres estats redox: completament oxidat (ubiquinona, CoQ₁₀), en un estat intermedi semiquinona (semiubiquinona, CoQ₁₀H[•]) i completament reduït (ubiquinol, CoQ₁₀H₂) (Figura 1). La capacitat d'estar en forma oxidada i reduïda li atribueix les dues funcions principals: com a transportador d'electrons a la CRM i com a antioxidant.

En primer lloc, el CoQ₁₀ es troba a la membrana mitocondrial interna (MMI) com a element lligat a la CRM a través del cicle Q (Stryter, 2004), que permet el pas d'ubiquinona a ubiquinol mitjançant la transferència d'electrons. La CRM s'estructura en un conjunt de 4 complexos multiproteïcs que a través d'un flux electrònic se sincronitzen per crear un gradient electroquímic, amb la finalitat de generar energia en forma d'ATP (Figura 3). Actualment existeix certa controvèrsia respecte la organització de la CRM. Tot i que les activitats enzimàtiques i funcions individuals dels components que hi participen estan ben definides, no es coneix del tot com és l'organització i s'han postulat diversos models en base a molts estudis experimentals. En conjunt, s'ha proposat un model plàstic (Acín-Pérez et al., 2008)

en el qual la CRM s'organitza en una xarxa d'associacions en supercomplexes respiratoris (SCs) i de complexos individuals. El CoQ₁₀ que hi ha a la MMI es troba dividit en diferents fraccions: una part ancorada al SC I-III, aparentment inamovible, i una part lliure, que facilita el transport electrònic entre els complexos II i III que no estan associats en SC (Genova et al., 2014). La distribució del CoQ₁₀ subdividit a la MMI fa que encaixi en aquest model d'organització supramolecular. Sigui com sigui, la ubiquinona accepta els electrons per dues entrades diferents a la CRM, la del complex I (NADH:ubiquinona oxido-reductasa, CI) a través del NADH, i la del complex II (succinat:ubiquinona oxido-reductasa, CII) a través del FADH₂. Independentment de per quin substrat la forma oxidada accepti els electrons, l'ubiquinol els transfereix al complex III (ubiquinol:citocrom c oxido-reductasa, CIII). Llavors, el citocrom c els transferirà al complex IV (citocrom c oxidasa, CIV), on l'acceptor final serà l'oxigen. Durant el flux electrònic es genera un bombeig de protons en contra de gradient que és utilitzat pel complex V (ATP sintetasa, CV) i es sintetitza ATP gràcies a la força motriu protònica (Figura 3).

En segon lloc, la naturalesa CoQ₁₀ com a antioxidant (Bentinger et al., 2007) deriva també de la capacitat redox, que li permet estabilitzar molècules, impeding l'oxidació de proteïnes, lípids i de l'àcid desoxiribonucleic (DNA) (Ernster & Dallner, 1995; Crane, 2007). És part del sistema d'eliminació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) i contribueix també regenerant altres antioxidants com la vitamina E o el tocoferol.

Pel que fa a altres funcions rellevants, el CoQ₁₀ estabilitza alguns complexos de la CRM (Santos-Ocaña et al., 2002), és un cofactor essencial de les proteïnes desacobladores (Echtay et al., 2000) –afavorint la translocació protònica dels àcids grassos a aquestes proteïnes per mantenir el potencial produït durant la CRM– i de moltes deshidrogenases mitocondrials, entre les quals està la dihidroorotat deshidrogenasa (DHODH) –la qual participa en la biosíntesi de pirimidines (Genova & Lenaz, 2011)– i la flavoproteïna deshidrogenasa (ETFDH) –que forma part de la beta-oxidació dels àcids grassos. Al mateix temps, modula la permeabilitat del porus de transició mitocondrial (Fontaine et al., 1998), evitant que es desencadenin els mecanismes d'apoptosi cel·lular (Turunen et al., 2004).

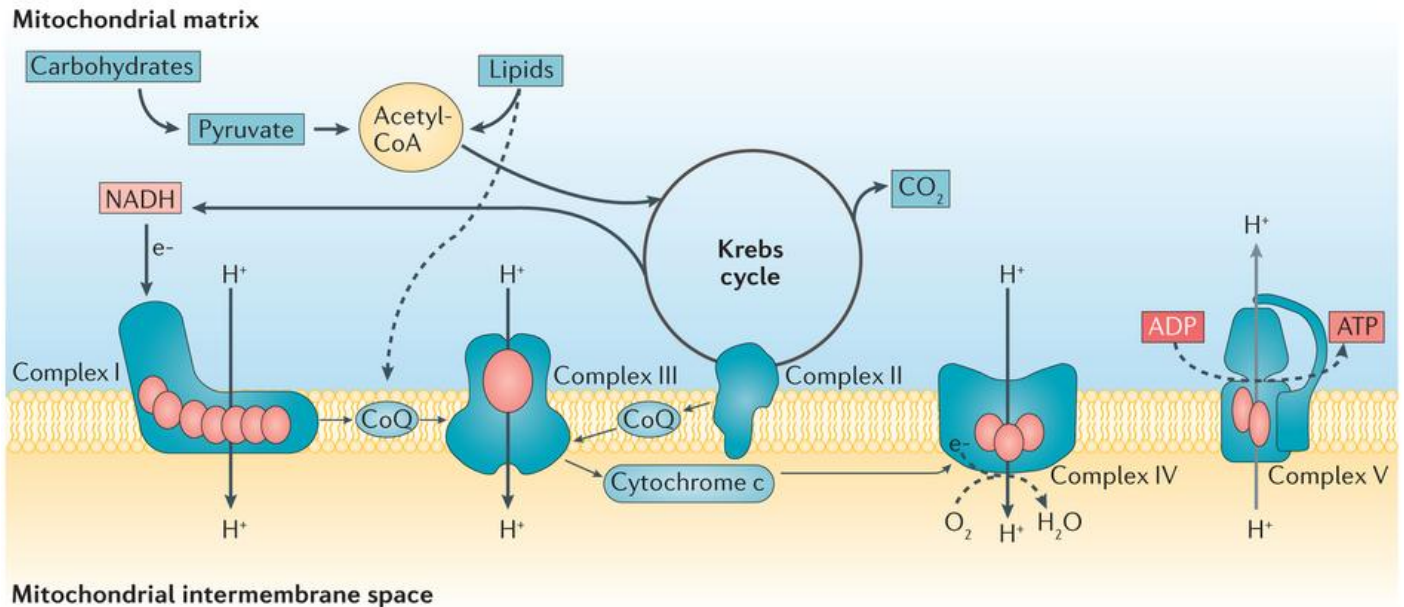


Figura 3. Metabolisme energètic mitocondrial i cadena respiratòria. El producte final del metabolisme dels carbohidrats i lipídics és l'Acetil-CoA (*Acetyl-CoA*), que s'oxida a través de les reaccions del cicle de Krebs (*Krebs cycle*) per produir CO₂. Els electrons (e⁻), produïts per aquestes reaccions, entren a la cadena respiratòria on es redueix l'oxigen molecular (O₂) per formar aigua (H₂O). La representació mostra els components de la CRM com a entitats individuals, per visualitzar la funció independent de cadascun. Ara bé, la organització supramolecular és diferent: el complex I és l'únic completament destinat a un supercomplex (el I-III₂-IV); mentre que els altres complexes també existeixen en forma lliure. El CoQ₁₀ (CoQ) estaria distribuït principalment en dues fraccions: la primera, més estàtica, enllaçant la transferència d'e⁻ dels complexos I al III, i la segona, més lliure, enllaçant la transferència d'e⁻ dels complexos II al III. Llavors, el citocrom c els transporta al complex IV, on l'acceptor final dels e⁻ és l' O₂. La energia alliberada per aquest procés s'usa per bombejar protons (H⁺) a través de la membrana mitocondrial interna i generar el gradient electroquímico que permet al complex V sintetitzar ATP. *Imatge obtinguda d'Emma et al., 2016*

2. DEFICIÈNCIES DE CoQ₁₀ EN PATOLOGIA HUMANA

2.1 Aspectes clínics

L'any 1989 es varen descriure els primers pacients amb malaltia mitocondrial associada a deficiència de CoQ₁₀ (Ogasahara et al., 1989). Eren dues germanes que presentaven una miopatia mitocondrial greu, amb un increment de creatina quinasa plasmàtica i una mioglobinúria recurrent, acidosi làctica i signes d'afectació del sistema nerviós central (SNC) (retràs mental i epilèpsia). En l'actualitat, i després de les diverses descripcions de casos amb síndrome de deficiència de CoQ₁₀, s'ha observat una gran variabilitat clínica, que oscil·la segons la edat de debut, la severitat dels símptomes, com de profunda és la depleció del CoQ₁₀ en teixits (principalment en múscul esquelètic) o la resposta clínica a la suplementació amb CoQ₁₀ (Miles et al., 2008). És molt important assolir un diagnòstic bioquímic precoç atès que pacients amb deficiència de CoQ₁₀ generalment han presentat bona resposta després de ser suplementats amb CoQ₁₀ (Pineda et al., 2010; Quinzii et al., 2005; Diomedi-Camassei et al., 2007; Montini et al., 2008), el qual demostra efectivitat ja que atura el progrés de la malaltia dels pacients, però té un efecte més limitat en el rescat del dany produït, especialment al SNC (Pineda et al., 2010).

No fou fins el 2006 que es van establir les bases moleculars dels primers pacients amb deficiències primàries de CoQ₁₀ (Quinzii et al., 2006). En l'article de Quinzii i col·laboradors, una mutació en homozigosi al gen *COQ2* explicava la deficiència primària de CoQ₁₀ en dos germans amb malaltia multisistèmica de debut infantil, però amb presentacions clíniques diferents. Un germà mostrava síndrome nefròtic, nistagmus, hipotonia i retràs psicomotor amb atròfia de cervell, de cerebel i lesions tipus "stroke-like"; mentre que la germana va presentar únicament síndrome nefròtic sense manifestacions neurològiques. Des de llavors, l'increment dels diagnòstics definitius de deficiència primària de CoQ₁₀ ha ampliat l'espectre fenotípic, que fins ara es classifica en cinc fenotips principals –encefalomiopatia, atàxia cerebel·losa, forma infantil multisistèmica, nefropatia i miopatia aïllada (Emmanuelle et al., 2012), malgrat seria més útil abordar la classificació per

fenotips clínics segons els gens *COQ* mutats (Desbats et al., 2015). A la taula 1 es descriuen els gens de la via del CoQ₁₀ i els fenotips clínics principals.

i. La forma encefalomiopàtica s'exhibeix com una tríada de miopatia mitocondrial, mioglobínúria recurrent i encefalopatia. És el fenotip dels primers pacients descrits (Ogasahara et al., 1989).

ii. La miopatia aïllada consisteix en episodis de debilitat muscular, mioglobínúria, intolerància a l'exercici i miàlgia, entre d'altres. En aquest grup s'han classificat pacients amb mutacions al gen *ETFDH* (deficiència secundària de CoQ₁₀) (Lalani et al., 2005; Horvath et al., 2006; Gempel et al., 2007) i també a *FDX1L* (Spiegel et al., 2014), que codifica per una proteïna encarregada de la transferència d'electrons a COQ6 (però la seva funció no és exclusiva en la biosíntesi del CoQ₁₀).

iii. La forma multisistèmica infantil presenta generalment una combinació d'encefalopatia i nefropatia (Rötig et al., 2000). Les manifestacions neurològiques més destacades són regressió psicomotora, atàxia, hipotonia, convulsions, síndrome piramidal, atròfia òptica amb retinopatia, debilitat, nefropatia progressiva, sordesa i síndrome de Leigh. A nivell renal bàsicament són síndromes nefròtics, però també s'han descrit casos amb tubulopatia. Mutacions en els gens *PDSS1* (Mollet et al., 2007), *PDSS2* (López et al., 2006), *COQ2* (Jakobs et al., 2013; Scalais et al., 2013) i *COQ9* (Duncan et al., 2009) s'han associat a aquesta forma infantil greu.

iv. L'atàxia cerebel·losa és el fenotip més comú amb el major nombre de pacients descrits (Musumeci et al., 2001). Es caracteritza per atàxia cerebel·losa i atròfia de debut durant la infància. A més, els pacients poden mostrar neuropatia, convulsions, retràs mental, desordres psiquiàtrics, debilitat muscular, hipotonia congènita, distonia, ptosi i oftalmoplegia, retinitis pigmentosa, atròfia òptica, apràxia oculomotora i hipogonadisme, entre d'altres (Musumeci et al., 2001; Lamperti et al., 2003; Gironi et al., 2004; Artuch et al., 2006; Lagier-Tourenne et al., 2008; Mollet et al., 2008). Bàsicament són les mutacions en *ADCK3* les que s'han relacionat amb aquest fenotip (Mollet et al., 2008; Horvath et al., 2012; Gerards et al., 2010; Mignot et al., 2013; Lagier-Tourenne et al., 2008; Blumkin et al., 2014; Liu

et al., 2014); però també deficiències secundàries per mutacions en el gen *APTX* descriuen pacients amb aquestes formes atàxiques (Quinzii et al., 2005).

v. La forma renal és un síndrome nefròtic resistent a esteroides per glomerulopatia. El debut és sobretot primerenc i s'ha reportat de forma aïllada (Heeriga et al., 2011) o bé en conjunció amb sordesa neurosensorial (Heeriga et al., 2011; Doimo et al., 2014). Pacients amb mutacions en *COQ6* (Heeriga et al., 2011; Doimo et al., 2014), *ADCK4* (Ashraf et al., 2013) i *COQ2* (McCarthy et al., 2013; Diomedi-Camassei et al., 2007) exhibeixen glomerulopaties.

vi. També hi ha pacients classificats com a casos atípics que no encaixen en cap dels 5 fenotips clàssics descrits prèviament, encara que probablement representin entitats amb deficiències secundàries de CoQ₁₀.

2.2 Deficiències primàries i secundàries

Tal com s'ha esmentat en l'apartat anterior, fou l'any 2006 quan Quinzii i col·laboradors varen diagnosticar el primer pacient amb deficiència primària de CoQ₁₀, amb mutacions en *COQ2*, un dels gens COQ exclusius de la via de síntesi (Quinzii et al., 2006). Encara que aquest grup consta de més de 13 gens, a dia d'avui són 8 els que s'han associat a fenotips humans (*PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ4*, *COQ6*, *ADCK3*, *ADCK4*, i *COQ9*) (Doimo et al., 2014) (Taula 1). Els pacients amb mutacions en aquests gens representen condicions genètiques d'herència recessiva i extremadament rares. Per exemple, el gen *ADCK3* té anotades 27 mutacions patològiques (a la base de dades *Human Gene Mutation Database* HGMD®) i és el causant de la malaltia en la majoria de pacients descrits. Fenotípicament, com ja hem vist, el rang de manifestacions clíniques s'ha anat ampliant amb afectació d'altres sistemes que s'escapen dels fenotips clàssics, generant condicions clíniques difícils de reconèixer.

Amb tot, la etiologia de les deficiències de CoQ₁₀ també pot ser secundària, és a dir, que la causa genètica és deguda a mutacions en gens aliens a la via de síntesi del CoQ₁₀. En aquestes circumstàncies, per tant, la deficiència de CoQ₁₀ és una conseqüència que pot intervenir en la fisiopatologia de la malaltia. Sovint es desconeixen els mecanismes pels quals es troba alterat el CoQ₁₀, i s'hipotetitza que podria haver defectes secundaris a la biosíntesi del CoQ₁₀. Per exemple, en el cas de

Gen	Fenotip clínic	n	CoQ Muscular (% reducció)	CoQ Fibroblastes (% reducció)	Referència
<i>PDSS1</i> <i>COQ2</i>	Malaltia multisistèmica, sordesa d'inici primerenc, encefaloneuropatia, obesitat, <i>livedo reticularis</i> i valvulopatia.	3	n.d.	75-96 %	Mollet et al., 2007
<i>PDSS2</i>	Pneumonia i hipotonia neonatal, convulsions refractàries, dificultat en la ingesta, encefalomiopatia i síndrome nefròtic.	2	86 %	87 %	Lopez et al., 2006
<i>COQ2</i>	Encefalomiopatia infantil, nefropatia, hipotonia, retràs psicomotor, atròfia òptica, tremolor, estatus epilèptic.	2	63 %	82 %	Quinzii et al., 2006
<i>COQ2</i>	Fallada multiorgànica neonatal, acidosi làctica, ventricle esquerre dilatat i hipocinèsia.	1	n.d.	28 %	Desbats et al., 2015
<i>COQ4</i>	Trets dismòrfics, debilitat, hipotonia, hiporeactivitat, discapacitat mental i encefalomiopatia.	1	n.d.	57 %	Salviati et al., 2012
<i>COQ4</i>	Èxitus precoç, hipotonia, insuficiència respiratòria, fallada cardíaca, hipoplàsia cerebel·losa antenatal i epilèpsia.	5	12-92 %	n.d.	Brea-Calvo et al., 2015
<i>COQ6</i>	Síndrome nefròtic resistent a esteroides amb sordesa neurosensorial.	13	n.d.	n.d.	Heeriga et al., 2011
<i>ADCK3</i>	Atàxia cerebel·losa progressiva, atròfia cerebel·losa, retràs del desenvolupament i convulsions.	4	70-94 %	Normal	Mollet et al., 2008
<i>ADCK3</i>	Atàxia de la marxa d'inici en la infància, atròfia cerebel·losa, amb progressió lenta.	7	54 %	36-49 % Normal en un cas	Lagier-tourenne et al., 2008
<i>ADCK3</i>	Pacients adults. Atàxia cerebel·losa, epilèpsia, símptomes musculars, espasticitat, distonia, tremolor, migranya. Discapacitat cognitiva.	22	5-68 %	n.d.	Horvath et al., 2012
<i>ACDK4</i>	Síndrome nefròtic resistent a esteroides. Glomeruloesclerosi.	15	n.d.	70 %	Ashraf et al., 2013
<i>COQ9</i>	Debut primerenc i èxitus. Convulsions intractables, cardiomiopatia hipertròfica i disfunció renal tubular. Retràs sever del desenvolupament global, microcefàlia i distonia.	1	84 %	59 %	Duncan et al., 2009

Taula 1. Principals característiques clíniques i bioquímiques dels pacients amb deficiència primària de coenzim Q₁₀. Es mostren els gens relacionats amb malaltia humana i el número de casos descrits en els articles amb més rellevància, així com els rangs de percentatges de reducció del CoQ₁₀ en teixit muscular o fibroblastes.

n: nombre de casos; n.d.: no disponible

la malaltia de Niemann Pick, l'acumulació d'èsters de colesterol inhibiria l'activitat de la via del mevalonat (Buján et al., 2014), o bé en la fenilcetonúria, on hi hauria una disminució relativa del precursor tirosina així com una inhibició secundària de la via del mevalonat pels valors elevats de fenilalanina (Artuch et al., 2003) (Figura 2A). També s'ha proposat, com a mecanisme general, un increment del recanvi per un augment del consum del CoQ₁₀ (González-Mariscal et al., 2014), com seria el cas de les malalties amb augment de l'estrès oxidatiu, però sense demostracions consistents. Fins i tot, en l'era de la seqüenciació massiva (NGS), on les eines tecnològiques estan potenciant el diagnòstic de nombrosos casos clínics no resolts, la majoria de deficiències bioquímiques de CoQ₁₀ no disposen d'un diagnòstic genètic definitiu. La manca d'un diagnòstic molecular impossibilita la classificació de les deficiències bioquímiques com a primàries o secundàries, si bé se sap que els defectes primaris són extraordinàriament infreqüents i probablement la majoria de les deficiències de CoQ₁₀ són secundàries a altres malalties, o estan associades a gens que encara es desconeixen. A la taula 2 es detallen les diferents malalties reconegudes actualment que associen deficiència secundària de CoQ₁₀, tan en teixits (Taula 2A) com en sang (plasma) (Taula 2B).

En aquesta tesi doctoral es presenten resultats que aporten coneixement respecte les deficiències secundàries de CoQ₁₀, que per la nostra experiència durant més de 10 anys en la investigació de malalties mitocondrials i en concret del CoQ₁₀, són les més habituals. Així doncs, hi ha diverses condicions que s'han associat a deficiències bioquímiques de CoQ₁₀. La majoria d'estudis realitzats fins ara indiquen que en malalties mitocondrials es troba de forma generalitzada una alteració del nivell de CoQ₁₀ en teixit muscular (Miles et al., 2008; Sacconi et al., 2010; Matsuoka et al., 1991), si bé no sembla ser una troballa universal sinó més aviat condicionada per factors individuals (Montero et al., 2005). En concret, s'han observat deficiències secundàries en malalties com per exemple la síndrome de Kearns-Sayre (Zierz et al., 1989) i les síndromes de depleció del DNA mitocondrial (mtDNA) (Montero et al., 2013), possiblement associades al mal funcionament generalitzat de la CRM, que es troba en situacions d'estrès cel·lular (Montero et al., 2013), o també en la deficiència múltiple d'Acil-CoA deshidrogenases (MADD per mutacions en *ETFDH*) (Gempel et al., 2007).

Taula 2A. Reducció de CoQ ₁₀ en teixits						
Malaltia	Gen	Percentatge de reducció del CoQ				Referències
		Mús	Fib	PI	Altres	
Miopaties mitocondrials						Matsuoka et al. 1991
• Deplecions del mtDNA		N-97 %	n.d.	n.d.		Montero et al. 2013
• Delecions del mtDNA (síndrome Kearns-Sayre)		37-94 %*	n.d.	B		Sacconi et al. 2010; Zierz et al. 1989
• Mutacions al mtDNA						
Síndrome de MELAS	<i>MT-TL1</i>	32-34 %*	42-43 %*	n.d.		Cotán et al. 2011; Sacconi et al. 2010
Síndrome de MERRF	<i>MT-TK</i>	48 %*	n.d.	n.d.		Sacconi et al. 2010
Deficiència múltiple d'Acil-CoA deshidrogenases (MADD)	<i>ETFDH</i>	78-82 %	n.d.	n.d.		Gempel et al. 2007
Síndrome d'atàxia oculomotora i apràxia (AOA1)	<i>APTX</i>	B	B	n.d.		Quinzii et al. 2005
Síndrome cardiofaciocutani (CFC)	<i>BRAF</i>	89 %	n.d.	n.d.		Aeby et al. 2007
Acidèmia propiònica (PA)	n.e.	n.d.	n.d.	n.d.	Mioc: 76 %	Baruteau et al. 2014
Acidèmia metilmalònica (MMA)	n.e.	n.d.	N-74 %	n.d.		Haas et al. 2009
Atàxia espinocerebel·losa (SCAR10)	<i>ANO10</i>	N-26 %	N	9 %	LCR: 9 %	Balreira et al. 2014
Encefalopatia epilèptica infantil	<i>TBC1D24</i>	68 %	n.d.	n.d.		Fragaki et al. 2016
Niemann Pick C (NPC)	<i>NPC1</i>	n.d.	25-35 %	n.d.		Buján et al. 2014

Taula 2. Llistat de malalties descrites a la literatura amb deficiència secundària de CoQ. **2A)** Malalties amb reducció de CoQ₁₀ en teixits: s'especifiquen les malalties o grups fenotípics on s'han descrit aquestes associacions, i els gens, en cas que s'hagin especificat. La taula recopila els valors de la disminució expressats en forma de rang de percentatge de reducció del CoQ₁₀, en múscul (Mús), fibroblastes (Fib), plasma (PI) o altres teixits (Mioc= miocardi, LCR= líquid cefaloraquídi).

N= valors normals; B= valors baixos; n.d.= valors no determinats; *= percentatge de reducció calculat en referència a la mitja dels controls; n.e.= no especificat

Taula 2B. Reducció de CoQ₁₀ en plasma			
Malaltia	Gen	OMIM	Referència
<i>Condicions genètiques minoritàries</i>			
Fenilcetonúria (PKU)	<i>PAH</i>	261600	Artuch et al. 1999
Acidúria mevalònica (MVA)	<i>MVK</i>	610377	Hubner et al. 1993; Hoffman et al. 1993
Síndrome de Sanfilippo (MPS-III)	*		Delgadillo et al. 2011
Niemann Pick C (NPC)	<i>NPC1</i>	257220	Fu et al. 2010
Atàxia de Friedreich (FRDA)	<i>FXN</i>	229300	Cooper et al. 2008
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO)	<i>DHCR7</i>	270400	Haas et al. 2008
Fibrosi quística	<i>CFTR</i>	219700	Oudshoorn et al. 2006
Malaltia de Huntington	<i>HTT</i>	143100	Andrich et al. 2004
<i>Malalties comuns</i>			
Hipertiroïdisme (GRD / HT)	**		Menke et al. 2004
Càncer			Cooney et al. 2011; Folkers et al. 1997; Palan et al. 2003; Rusciani et al. 2006; Chai et al. 2010
Malalties cardiovasculars			Hughes et al. 2002; Molyneux et al. 2008
Diabetes mellitus tipus II			Watts et al. 1998
Fibromiàlgia			Maes et al. 2009; Cordero et al. 2011; Miyamae et al. 2013
Cirrosi hepàtica i alcoholisme crònic			Bianchi et al. 1994
Pàrquinson			Shults et al. 1997; Shults et al. 2005

Taula 2. Llistat de malalties descrites a la literatura amb deficiència secundària de CoQ. **2B)** Malalties amb reducció de CoQ₁₀ en plasma. En la primera secció es mostren les condicions genètiques associades a malalties rares, mentre que en la segona es detallen les malalties comuns (algunes d' etiologia ambiental) amb alteració del CoQ₁₀ a nivell plasmàtic.

GRD=Graves disease; HT=Hashimoto thyroiditis; *= més d'un gen associat, diagnòstic no especificat a la publicació; **= malalties sense base molecular establerta

D'altra banda, s'han diagnosticat deficiències bioquímiques de CoQ₁₀ musculars en patologies no causades directament per una alteració del metabolisme energètic. Un dels primers exemples és la síndrome d'atàxia oculomotora i apràxia (Date et al., 2001; Moreira et al., 2001), causat per truncament de l'aprataxina (gen *APTX*), una proteïna que participa en la reparació de doble cadena del DNA (Musumeci et al., 2001; Quinzii et al., 2005; Le Ber et al., 2007). També s'han descrit casos aïllats amb deficiència de CoQ₁₀, com un pacient amb presentació multisistèmica infantil amb síndrome cardiofaciocupatària (causada per mutacions en el gen *BRAF*) (Aeby et al., 2007), i en un llistat llarg d'altres malalties rares i prevalents (Taula 2). En la

majoria de situacions els mecanismes pels quals es produeix una depleció de la fracció del CoQ₁₀ es desconeix, així com les conseqüències que aquesta deficiència té en la simptomatologia del pacient; però la demostració d'efectes beneficiosos de la suplementació amb CoQ₁₀ en alguns pacients (Horvath, 2012) justifica la necessitat de definir els trets bioquímics de moltes malalties greus que no disposen d'alternatives de tractament.

A part, no menys importants pel coneixement dels mecanismes subjacents de certes malalties són les reduccions de CoQ₁₀ que trobem a nivell plasmàtic (Taula 2B). Aquesta disminució del CoQ₁₀ circulant no es considera una deficiència endògena, perquè no implicaria directament deficiència a nivell cel·lular, si bé tampoc es coneix si una deficiència plasmàtica podria conduir a un defecte de CoQ₁₀ en els teixits. Hi ha diverses malalties associades a variació del CoQ₁₀ plasmàtic. El nostre grup va demostrar per primera vegada que els pacients amb fenilcetonúria presenten una deficiència en plasma de CoQ₁₀ en un percentatge molt important dels pacients (Artuch et al., 2003). També s'ha detectat disminució de CoQ₁₀ al plasma en la deficiència de mevalonat quinasa (Hübner et al. 1993; Hoffman et al., 1993) i en altres condicions genètiques o no genètiques que s'escapen del nostre espectre d'estudi, com la fibromiàlgia, el parkinsonisme o el càncer; situacions on el balanç antioxidant es troba alterat degut a múltiples factors entre els quals hi ha una disfunció mitocondrial. El nostre grup també va identificar, per primera vegada, un estat de deficiència de CoQ₁₀ plasmàtic en pacients amb mucopolisacaridosi (MPS) de varis tipus, que són malalties d'acúmul lisosomal, en el context d'un assaig clínic on es monitoritzaven diversos antioxidants atès que els pacients estaven sent tractats amb genisteïna (Delgado et al., 2011). Com a part de aquesta tesi, ens vàrem proposar confirmar aquestes troballes en pacients amb MPS tipus III, tractant d'establir factors etiològics responsables de la deficiència de CoQ₁₀.

Tot i que en aquestes situacions la deficiència és un fenomen secundari, probablement accentuï els símptomes i signes clínics causats pel defecte primari, i molts pacients es poden beneficiar de suplementació amb CoQ₁₀, encara que la resposta no sigui tan positiva com en els pacients amb deficiències primàries (Quinzii et al., 2005).

2.3 Fisiopatologia de les deficiències de CoQ₁₀

En general, l'efectivitat dels tractaments amb CoQ₁₀ depèn de la precocitat de la suplementació, ja que aparentment atura, en cert grau, el progrés de la malaltia, però té efectes limitats en el rescat del dany produït, sobretot en una àrea tan sensible com el SNC, que es veu afectat de forma majoritària en els pacients amb deficiències de CoQ₁₀ (Pineda et al., 2010). Atès que el CoQ₁₀ forma part d'OXPPOS, la fisiopatologia de la seva deficiència va primordialment lligada a la disminució de la producció d'ATP (Quinzii et al., 2008). No obstant això, els mecanismes patogènics de la deficiència de CoQ₁₀ poden implicar altres de les funcions en les quals participa. Per exemple, s'ha demostrat una alteració del metabolisme dels nucleòtids en fibroblasts deficients de CoQ₁₀ (López-Martín et al., 2007), així com un increment de l'apoptosi (Heeringa et al., 2011) i aparició de mitofàgia com a mecanisme protector (Rodríguez-Hernández et al., 2009; Cotan et al., 2011). Com a efecte especialment rellevant, sembla que existeix també una disfunció del sistema antioxidant cel·lular, ja que s'ha observat, per exemple, que la afectació renal correlaciona amb un increment en la producció de ROS en aquest teixit (Quinzii et al., 2013).

3. DIAGNÒSTIC DE LES DEFICIÈNCIES DE CoQ₁₀

Tradicionalment, les anàlisis bioquímiques són les que defineixen una deficiència de CoQ₁₀. L'elecció del teixit o fluid biològic adequat per la determinació és essencial per tal d'obtenir els valors de CoQ₁₀ més fiables, i evitar tant com es pugui procediments invasius, especialment en infants. Malauradament, no és possible distingir bioquímicament entre deficiències primàries o secundàries i, degut a la complexitat de les malalties mitocondrials, un percentatge important de pacients amb deficiència de CoQ₁₀ queden sense diagnosticar (Desbats et al., 2015; Emmanuele et al., 2012). Entendre si un pacient presenta deficiència primària o secundària és essencial pel pronòstic de la condició i per un consell mèdic adequat.

3.1 Diagnòstic bioquímic

El diagnòstic de deficiència de CoQ₁₀ és bioquímic, habitualment a través de la detecció de la reducció de la concentració de CoQ₁₀ en mostres de teixit muscular o de cultius de fibroblasts. El diagnòstic genètic permet la diferenciació entre etiologia primària o secundària, però la complexitat que engloba les malalties mitocondrials fa que el diagnòstic genètic encara sigui difícil d'assolir. Bioquímicament, els pacients presenten un patró comú (López et al., 2014): un grau variable de deficiència de CoQ₁₀ en teixits que causa una reducció variada i, sempre parcial, de l'activitat enzimàtica dels complexos de la CRM que depenen del CoQ₁₀; el CI+III i CII+III. L'enllaç entre la reducció de CoQ₁₀ i la disfunció dels CI+III i CII+III s'espera que així sigui perquè una baixa disponibilitat de CoQ₁₀ mitocondrial alteraria la transferència electrònica, essencial per la producció d'ATP (Lamperti et al., 2003; Lalani et al., 2005; Miles et al., 2005). L'anàlisi del CoQ₁₀ es pot realitzar en diverses mostres biològiques: en plasma, cèl·lules mononuclears de la sang i plaquetes, en múscul esquelètic, en fibroblasts cultivats de biòpsies de pell i en líquid cefaloraquídi (LCR) (Artuch et al., 2004; Duberley et al., 2013).

3.1.1. Plasma

Els valors de CoQ₁₀ en plasma venen determinats per la incorporació exògena a través de la dieta i la biosíntesi hepàtica. La mesura del contingut de CoQ₁₀ plasmàtic en les deficiències primàries de CoQ₁₀ no és predictiva de la concentració real del CoQ₁₀ en teixits (Salviati et al., 2005), ja que potencialment hi hauria una correcció parcial del defecte per fonts dietètiques de CoQ₁₀. No obstant això, la determinació de CoQ₁₀ en plasma té valor per la monitorització del tractament amb CoQ₁₀ i també té valor diagnòstic en les diverses malalties esmentades anteriorment. Únicament les determinacions en fibroblasts o múscul tenen un valor predictiu de l'estat real del CoQ₁₀ pel diagnòstic de les malalties mitocondrials associades a deficiència de CoQ₁₀ (Montero et al., 2008; Yubero et al., 2015). Tanmateix, s'han realitzat estudis en cèl·lules mononuclears de la sang, així com en plaquetes (Duncan et al., 2005; Shults et al., 1997; Mortensen et al., 1998), que malgrat s'ha demostrat que podrien ser utilitzades per fer una estimació de l'estat del CoQ₁₀ endogen (Duncan et al., 2005; Niklowitz et al., 2004), no s'utilitzen de forma quotidiana en el diagnòstic clínic.

3.1.2. Múscul

El teixit més utilitzat per avaluar les deficiències de CoQ₁₀ és el múscul esquelètic, on es determina la concentració de CoQ₁₀ en paral·lel a l'estudi de l'activitat dels complexos enzimàtics de la CRM. A la taula 3 s'especifiquen els valors normals establerts per diferents grups per la determinació del CoQ₁₀ en múscul o fibroblasts; així com la metodologia aplicada. La cromatografia líquida d'alta precisió (HPLC), acoblada a diferents sistemes de detecció (ultravioleta, electroquímica) (revisat a Yubero et al., 2014), ha estat l'estàndard per valorar el CoQ₁₀; i les activitats dels enzims de la CRM (I-IV) s'estudien per assaigs espectrofotomètrics. Ambdues valoracions es normalitzen amb el contingut total de proteïna o bé amb l'activitat de l'enzim de la matriu mitocondrial citrat sintasa (CS), que és utilitzat com a indicador d'abundància mitocondrial (Reisch & Elpeleg, 2007). Normalitzar per l'activitat CS facilita la detecció de defectes enzimàtics parcials en malalties amb proliferació mitocondrial compensatòria, mentre que normalitzar per proteïnes totals podria desemmascarar defectes enzimàtics de la CRM en situacions amb activitat reduïda de CS, com per exemple en els casos de

síndrome de depleció del mtDNA (Spinazzola et al., 2011; Sarzi et al., 2007; Tesarova et al., 2004).

Mètode d'anàlisi	Múscul		Fibroblastes		Referència
	CoQ ₁₀ (nmol/g proteïna)	CoQ ₁₀ (nmol/U CS)	CoQ ₁₀ (g de teixit)	CoQ ₁₀	
HPLC-UV (275 nm)	1440-2260 (1811)*			43-51 (48) ng/mg de proteïna	Ogasahara et al., 1989
HPLC-UV (275 nm)	140-580 (241)			39-75 (62) nmol/g de proteïna	Duncan et al., 2009
HPLC-ED	117-312 (214)				Miles et al., 2004
HPLC-ED	110-480 (231)	2.7-8.5 (5.4)		48-112 (67) nmol/g de proteïna	Montero et al., 2008
HPLC-UV (275 nm)		2.7-7.0 (4.7)			Horvath et al., 2006
HPLC-UV (275 nm)	140-580 (213)				Rahman et al., 2001
HPLC-UV (275 nm)			24.0-39.5 (31.5) nmol/g de teixit		Sacconi et al., 2010
HPLC-ED			20-79 (37.4) µmol/g de teixit		Terracciano et al., 2012
HPLC-ED			21.7-88.7 (33.0) µmol/g de teixit		Pastore et al., 2012
HPLC-ED			18.5-45.7 (32.1) µg/g de teixit	34-70.4 (52.2) ng/mg de proteïna	Lopez et al., 2006
HPLC-ED				50.3-66.7 (58.5) ng/mg de proteïna	Lagier-Tourenne et al., 2008
HPLC-MS/MS			12.6-51.8 (32.2) pmol/mg de teixit	56-184 (120) nmol/g de proteïna	Mollet et al., 2008
HPLC-MS/MS				2.0-2.8 (2.4) nmol/Unitats CS	Buján et al., 2014

Taula 3. Valors de referència dels nivells de CoQ₁₀ en múscul i fibroblastes amb els diferents mètodes d'anàlisi descrits a la literatura. Els valors s'expressen en diferents unitats, segons els centres, com a: rang (mediana). Pel que fa als valors de referència en múscul i fibroblastes, la majoria d'autors descriuen intervals de referència consistents, mentre que es destaquen diferències notables en altres. Segons això, l'ús de protocols validats juntament amb programes de control de qualitat externs sembla ser necessari per minimitzar aquestes diferències.

CS= citrat sintasa; HPLC-UV= cromatografia líquida d'alta precisió amb detecció ultravioleta; HPLC-ED= cromatografia líquida d'alta precisió amb detecció electroquímica; HPLC-TMS= cromatografia líquida d'alta precisió acoblada a espectrometria en tàndem masses; *Dades expressades com a ng/mg de proteïna

Les activitats dels enzims de la CRM dependents de CoQ₁₀ correlacionen amb el contingut total de CoQ₁₀ en múscul, i amb l'activitat CS (Montero et al., 2005; Miles et al., 2008), així com amb altres marcadors de disfunció mitocondrial, com el percentatge d'agregats mitocondrials subsarcolèmics (Miles et al., 2008). Tot i això, la interpretació d'aquestes dades bioquímiques dins del procés diagnòstic és complicada, i sembla que hi ha limitacions importants ja que moltes vegades, resultats normals estan presents en pacients amb diagnòstic de malaltia mitocondrial, i resultats anòmals poden observar-se en malalties no mitocondrials. En aquest sentit, és important buscar noves formes d'interpretació conjunta d'aquestes dades bioquímiques, i el CoQ₁₀ podria ser també un marcador de massa i funció mitocondrial útil en el procés diagnòstic, més enllà de la identificació de la seva deficiència (Miles et al., 2008). En altres paraules, la determinació sistemàtica del valor del CoQ₁₀ en biòpsia muscular seria recomanable dins del procés diagnòstic de malaltia mitocondrial.

3.1.3. Fibroblasts

Com que la realització de biòpsies musculars és un procediment invasiu, la utilització d'altres tipus de mostres ha aportat una bona alternativa a l'hora del diagnòstic; a més tenint en compte que sembla que existeix especificitat de teixit en les deficiències de CoQ₁₀ (Lagier-Tourenne et al., 2008), fet que significa que la deficiència de CoQ₁₀ en un teixit no implica que es detecti en altres teixits. Els cultius de fibroblasts aporten un valor afegit al diagnòstic, ja que no només es mesuren els nivells de CoQ₁₀, sinó que permeten realitzar estudis funcionals de la seva via de síntesi (Buján et al., 2014) i dels efectes de la suplementació amb CoQ₁₀, que permeten valorar si hi ha correcció dels nivells d'aquest i d'altres funcions mitocondrials (per exemple la normalització de las activitats de la CRM dependents de CoQ₁₀ o de l'estrès oxidatiu) (Desbats et al., 2015). No obstant això, els fibroblasts no sempre reproduïxen la situació al múscul, de manera que la normalitat de l'estat del CoQ₁₀ en aquestes cèl·lules no exclou una deficiència en múscul o en altres òrgans. Ara bé, també s'han descrit pacients amb nivells normals de CoQ₁₀ en múscul però que demostraven reducció de CoQ₁₀ en fibroblasts, suggerint que l'obtenció i l'estudi d'ambdós espècimens és

recomanable durant el procés diagnòstic de malaltia mitocondrial i dèficit de CoQ₁₀.

3.1.4. Líquid cefaloraquidi

Degut al predomini d'afectació neurològica en aquest conjunt de síndromes de deficiència de CoQ₁₀, alguns estudis en LCR han intentat aportar noves eines diagnòstiques (Artuch et al., 2004; Duberley et al., 2013). Malauradament, les baixes concentracions en aquesta mostra biològica i la invasivitat per l'obtenció de la mostra de LCR han desviat aquests estudis de la pràctica clínica.

3.1.5. Altres

Últimament s'ha observat una creixent implicació del ronyó com a òrgan afecte en els defectes primaris de CoQ₁₀, principalment glomerulopaties amb síndrome nefròtic corticoresistent (Heeringa et al., 2011), però també tubulopaties. Considerem important l'estudi d'aquest òrgan de forma no invasiva, perquè la pràctica d'una biòpsia renal és difícil de justificar, i més encara ho és l'obtenció de teixit control procedent de pacients sans, que seria imprescindible per una interpretació acurada dels resultats. En aquest sentit, vàrem pensar que l'anàlisi del CoQ₁₀ en orina –en les cèl·lules de descamació epitelial i tubular, obtingudes del sediment urinari–, podria ser una bona eina de diagnòstic per estudiar malalties renals comunes i associades a malalties mitocondrials.

3.2 Diagnòstic genètic

Després d'establir el diagnòstic bioquímic, el pas següent és la identificació del defecte genètic específic. L'aproximació tradicional era la seqüenciació seriada dels gens COQ de forma individual i d'altres possibles gens causants de deficiències secundàries. Aquesta estratègia implicava molts costos, massa temps i poca efectivitat, principalment a causa que ni clínicament ni bioquímicament existeixen pistes que ens orientin a gens candidats en concret. A més, i pel nombre creixent de gens implicats a les deficiències de CoQ₁₀, aquesta estratègia ha sigut progressivament substituïda per les noves tècniques de NGS (Reuter et al., 2015). Així, la NGS ha canviat profundament el procés diagnòstic (Schnekenberg & Németh, 2013; Biesecker & Green, 2014; Yavarna et al., 2015). Gràcies a la facilitat d'estudiar paral·lelament múltiples gens candidats, l'estudi genètic comença a

situar-se al primer o segon nivell d'investigació, segons els casos. Pel que fa referència a les deficiències de CoQ₁₀, la determinació d'aquest en teixits o fluids biològics és, encara avui, una eina de primera elecció, sobretot degut a que és ràpida i permet la identificació i correcció posterior per mitjà del tractament de l'estat de deficiència de CoQ₁₀. En altres casos, l'anàlisi bioquímic o enzimàtic passaria a una segona fase de validació de les troballes genètiques, si hi ha una sospita clínica molt consistent. L'anàlisi de dades genòmiques és complexa, sobretot quan ens trobem davant de malalties amb tanta variabilitat clínica, per les quals la informació bioquímica, histoquímica i enzimàtica encara és essencial per agilitzar el procés diagnòstic.

En l'àmbit hospitalari s'apliquen diferents opcions d'aproximació genètica a través de tècniques de NGS, segons el nombre de gens a estudiar i el tipus de malalties. En primer lloc, amb la utilització de panells gènics es pot avaluar un nombre d'amplicons limitat. Un panell, que pot ser de disseny propi o comercial, és una selecció de regions genòmiques que es desitgen enriquir amb protocols de captura del DNA, previ a la tecnologia de seqüenciació massiva aplicada. En el nostre terreny d'estudi, les regions diana són gens nuclears causants de malalties mitocondrials, incloent tots aquells implicats en la biosíntesi del CoQ₁₀ i també altres amb funció mitocondrial, els quals condicionarien un defecte secundari. Aquesta estratègia és adequada, perquè el fet de disposar de poques dianes per seqüenciar permet modular les característiques de la seqüenciació, essent possible assolir una major qualitat de cobertura vertical (nombre de vegades que una mateixa posició nucleotídica del DNA és llegida pel seqüenciador), absolutament imprescindible en el diagnòstic de malalties rares, on es cerquen variants molt infreqüents a la població. Igualment, la utilització de panells gènics és adient només si el pacient està molt ben caracteritzat, ja que resulta poc rentable quan, posteriorment, s'han d'utilitzar estratègies més potents que comprenen aquests gens inicials i molts més.

Una segona aproximació, més ambiciosa, és l'aplicació del que es coneix com a exoma clínic. Consisteix en la seqüenciació simultània de les regions codificants i flanquejants dels 4813 gens associats a patologia (segons tres bases de dades de malalties mendelianes: *HGMD*, *GeneTest* i *OMIM*). Sovint, els pacients estan menys

orientats a sospites diagnòstiques específiques. Per això, en aquests casos, la interpretació de les dades obtingudes es torna més complexa i alenteix el diagnòstic. Tot i això, és interessant per la pràctica clínica, i s'espera que substitueixi gradualment als panells gènics.

El tercer lloc l'ocuparien els estudis d'exoma (*whole exome sequencing*) i genoma (*whole genome sequencing*) complets, encara amb poca aplicació a la pràctica diagnòstica. Fins ara, s'han estat utilitzant aquestes estratègies a través de projectes d'investigació, ja que tant l'anàlisi bioinformàtic i interpretació biològica com els posteriors estudis funcionals requereixen de recursos que poden allargar els diagnòstics a temps d'espera massa llargs. En aquest sentit, la nostra experiència amb seqüenciació d'exoma ens ha permès identificar les causes moleculars en pacients amb sospita de malaltia mitocondrial (per exemple, un parell de casos amb mutacions als gens *NGLY1* i *FBXL4*, no publicats), però encara tenim casos d'estudis d'exoma sense resoldre.

La última consideració a tenir en compte, pel que fa al diagnòstic genètic, és que l'mtDNA representa una contribució important en la etiologia d'aquestes malalties. Moltes de les mutacions primàries al genoma mitocondrial no es detecten pels procediments esmentats anteriorment i, de fet, les delecions i les mutacions puntuals de l'mtDNA s'haurien d'investigar a part, complicant el procés diagnòstic. No existeixen recomanacions concretes, però hi ha certes qüestions bàsiques per tal de valorar si la causa d'una malaltia amb afectació del metabolisme energètic depèn d'alteracions en el sistema genètic mitocondrial. Per començar, una bona història clínica és imprescindible, especialment pel que fa als antecedents familiars d'origen matern. L'edat del pacient també és clau, ja que, en principi, aquests pacients no debuten neonatalment sinó que presenten quadres més tardans i progressius. A més, existeixen fenotips mitocondrials clàssics i reconeixibles associats a mutacions de l'mtDNA (MERFF, Kearns Sayre, NARP, MELAS, etc), sense oblidar que en l'àmbit pediàtric els fenotips que mostren els pacients sovint són incomplets.

JUSTIFICACIÓ DE LA UNITAT TEMÀTICA

L'àrea principal de treball se situa en el context de les malalties genètiques del metabolisme energètic mitocondrial, malalties rares i hereditàries que afecten al conjunt de sistemes que utilitza l'organisme per incorporar i transformar els substrats en energia utilitzable pel funcionament cel·lular. El departament d'errors congènits del metabolisme de l'Hospital Sant Joan de Déu ha impulsat, durant anys, l'estudi i recerca en aquesta àrea de coneixement a través de la implementació, tant a nivell bioquímic com molecular, de tècniques per l'assoliment d'un diagnòstic definitiu inequívoc i ràpid. Així doncs, dins d'aquesta unitat de treball, una de les línies de recerca en el marc de diversos projectes FIS concedits és l'estudi de les deficiències de CoQ₁₀. Les deficiències de CoQ₁₀ poden ser degudes a causes primàries o secundàries, tan mitocondrials com no mitocondrials, i s'associen a estats de malaltia amb expressions fenotípiques heterogènies. Essent el CoQ₁₀ un component del sistema OXPHOS, la seva deficiència implica una disfunció, que afectarà de forma diferent i indeterminada als diferents òrgans i teixits depenent dels nivells energètics que requereixin i d'altres factors, la majoria desconeguts. La síndrome de deficiència de CoQ₁₀ es classifica dins del grup de les malalties mitocondrials, entitats clíniques amb afectació multiorgànica causades per l'alteració de la maquinària mitocondrial, i per tant del metabolisme energètic, a qualsevol nivell. A través d'una col·laboració multidisciplinària entre diversos centres de recerca i hospitalaris mitjançant la xarxa CIBER de malalties rares (CIBERER), s'ha pogut avançar en la caracterització fenotípica, bioquímica i molecular de diferents malalties que presenten deficiència de CoQ₁₀. L'experiència durant anys en l'estudi de centenars de pacients permet realitzar una aproximació més global i una millor comprensió de les deficiències de CoQ₁₀. Per assolir una millora del diagnòstic d'aquests pacients, s'ha continuat amb l'estudi sistemàtic del CoQ₁₀ en diverses mostres biològiques en associació amb dades clíniques, bioquímiques, histoquímiques i moleculars. El màxim interès roman en el valor terapèutic potencial del CoQ₁₀ com a suplement. Una subministració a temps millorarà el pronòstic dels pacients amb manca dels nivells intracel·lulars adequats per un correcte funcionament i viabilitat cel·lular, sobretot en els teixits amb més necessitats energètiques.

Per assolir els objectius que ens proposem, dins l'àmbit hospitalari i sempre en relació amb la investigació orientada al pacient, en aquesta tesi hem pretès millorar aspectes del diagnòstic bioquímic de les deficiències de CoQ₁₀, així com de descriure malalties en les que per primera vegada s'associa una alteració en l'estat del CoQ₁₀.

OBJECTIUS

L'objectiu principal de la present tesi doctoral és la millora del diagnòstic de pacients amb deficiències de coenzim Q₁₀ a través de l'estudi sistemàtic del coenzim Q₁₀ en diverses mostres biològiques en associació amb dades clíniques, bioquímiques, histoquímiques, enzimàtiques i moleculars.

Els objectius concrets són els següents:

1. Estudiar l'estat del coenzim Q₁₀ en una cohort gran de pacients, amb diagnòstic molecular definitiu, analitzada durant els últims anys en diversos centres europeus.

2. Identificar noves causes d'alteracions de l'estat del coenzim Q₁₀, concretament en malalties com la deficiència de piruvat deshidrogenasa, del transportador de glucosa al cervell GLUT-1 i en les malalties lisosomals, plantejant aspectes fisiopatològics i terapèutics.

3. Implementar avenços metodològics pel diagnòstic o seguiment de pacients amb deficiències de coenzim Q₁₀ i malalties mitocondrials: anàlisi del coenzim Q₁₀ en mostres d'orina i estimació del valor del coenzim Q₁₀ com a biomarcador potencial de massa i volum mitocondrial.

RESULTATS

INFORME DELS DIRECTORS

La memòria de la Tesi Doctoral “Estudi del coenzim Q₁₀ en pacients neuropediàtrics; avenços diagnòstics i identificació de noves causes d’alteracions secundàries” presentada per Dèlia Yubero Siles, es presenta com un compendi de 6 publicacions, 4 ja publicades i dues sotmeses a publicació. La doctoranda Dèlia Yubero ha participat de forma activa en la part experimental, en la interpretació de dades i en la redacció de tots els articles derivats d’aquesta tesi. Això ha estat possible gràcies a la seva contractació al nostre hospital per mitjà d’una beca de l’*Instituto de Salud Carlos III* (beca PFIS: FI12/00580) associada als projectes FIS enfocats a la caracterització fenotípica i molecular del síndrome de deficiència del coenzim Q₁₀ (PI11/02350, PI14/00028). Totes les publicacions que consten aquí formen part del nucli de la present tesi, i no seràn utilitzades en altres tesis doctorals, si bé la segona publicació és un estudi col·laboratiu on una part important del treball experimental s’ha realitzat en un altre centre de recerca.

PUBLICACIÓ 1. *Secondary CoQ deficiencies associated to mitochondrial and non mitochondrial diseases.* Dèlia Yubero, Raquel Montero, Miguel A Martín, Julio Montoya, Antonia Ribes, Manuela Grazina, Iain P Hargreaves, Leonardo Salviati, Plácido Navas, Rafael Artuch and CoQ Working Goup. **Mitochondrion (sotmès a publicació).**

La doctoranda, Dèlia Yubero, ha contribuït en tot el procés d’aquest estudi multicèntric, a través de l’anàlisi del coenzim Q₁₀ en biòpsies, de l’estudi genètic de varis casos, de la compilació de dades de pacients i posterior anàlisi estadístic. Ha participat en la interpretació dels resultats i en la escriptura del manuscrit.

PUBLICACIÓ 2. *Severe encephalopathy associated to pyruvate dehydrogenase mutations and unbalanced Coenzyme Q content.* Claudio Asencio, María A Rodríguez-Hernandez, Paz Briones, Julio Montoya, Ana Cortés, Sonia Emperador, Angela Gavilán, Eduardo Ruiz-Pesini, Dèlia Yubero, Raquel Montero, Mercedes Pineda, María M O’Callaghan, María Alcázar-Fabra, Leonardo Salviati, Rafael Artuch, Plácido Navas. **European Journal of Human Genetics 2016 Mar;24(3):367-72.** Índex d’impacte (2014): 4.349 (Q1).

La segona publicació no forma part de cap tesi doctoral a banda d'aquesta, on es presenta com a estudi suplementari que dóna pes al segon objectiu. La doctoranda ha intervingut en la realització d'aquest estudi a través de la quantificació del contingut de coenzim Q₁₀, de la recopilació de dades dels pacients estudiats i en la revisió crítica del manuscrit. En la present tesi ens centrem en els aspectes desenvolupats directament per la doctoranda.

PUBLICACIÓ 3. *Association between coenzyme Q10 and glucose transporter (GLUT1) deficiency.* Dèlia Yubero, María M O'Callaghan, Raquel Montero, Aida Ormazábal, Judith Armstrong, Carmen Espinós, María Angeles Rodríguez, Cristina Jou, Esperanza Castejón, MA Aracil, MV Cascajo, Angela Gavilán, Paz Briones, Cecilia Jimenez-Mallebrera, Mercedes Pineda, Plácido Navas, Rafael Artuch. **BMC Pediatrics 2014 Nov 8;14:284.** Índex d'impacte (2014): 1.930 (Q2).

La doctoranda ha estat responsable de part del treball experimental, principalment dels estudis genètics del gen *SLC2A1* en DNA genòmic i DNA codificant aïllat de cultius de fibroblasts (MLPA, SANGER, PCR en temps real), que queda palesa en la figura 2. Ha intervingut en la interpretació dels resultats i en la redacció del manuscrit.

PUBLICACIÓ 4. *Coenzyme Q10 and pyridoxal phosphate deficiency is a common feature in mucopolysaccharidosis type III.* Dèlia Yubero*, Raquel Montero*, Mar O'Callaghan, Mercè Pineda, Silvia Meavilla, Veronica Delgadillo, Cristina Sierra, Laura Altimira, Plácido Navas, Simon Pope, Marcus Oppenheim, Viruna Neergheen, Arunabha Ghosh, Phillipa Mills, Peter Clayton, Emma Footitt, Maureen Cleary, Iain Hargreaves, Simon A Jones, Simon Heales, Rafael Artuch. **JIMD Reports 2015 Jul 24; pp1-7 [Epub ahead of print].** Sense índex d'impacte (estimat pel 2016).

La doctoranda ha estat responsable de part del treball experimental i comparteix co-autoria amb la segona signant, que és co-directora d'aquesta tesi. La seva contribució ha consistit en la selecció de mostres, procediments analítics i recollida de dades, així com l'anàlisi estadístic i ha participat en la redacció del manuscrit.

PUBLICACIÓ 5. *Determination of urinary coenzyme Q10 by HPLC with electrochemical detection: Reference values for a paediatric population.* Dèlia

Yubero, Raquel Montero, Maria Ramos, Viruna Neergheen, Plácido Navas, Rafael Artuch, Iain Hargreaves. **Biofactors** 2015 Nov 12;41(6):424-30. Índex d'impacte (2015): 4.592 (Q1).

La doctoranda ha realitzat tot el treball experimental del present estudi: recollida de mostres de controls, disseny de condicions pre-analítiques i metrològiques, procediment analític i realització dels valors de referència. També s'ha encarregat de la redacció del manuscrit.

PUBLICACIÓ 6. *A statistical algorithm showing coenzyme Q₁₀ and citrate synthase as biomarkers of mitochondrial activity.* Dèlia Yubero, Aritz Adín, Raquel Montero, Cristina Jou, Cecilia Jiménez-Mallebrera, Àngels García-Cazorla, Andrés Nascimento, Maria del Mar O'Callaghan, Julio Montoya, Plácido Navas, Antonia Ribes, Maria Dolores Ugarte, Rafael Artuch. **Nature methods (preparat per sotmetre a publicació).**

Aquest treball representa una col·laboració amb la facultat de matemàtiques de la Universidad Pública de Navarra. El desenvolupament de l'algoritme matemàtic corre a càrrec dels estadístics implicats en el treball. La doctoranda ha participat en la quantificació del CoQ₁₀ i en l'anàlisi estadístic inicial, del qual va derivar la hipòtesi que seria útil identificar poblacions amb alts graus de correlació i que el CoQ₁₀ podria ser un biomarcador de volum i massa mitocondrial almenys tan vàlid com ho és l'activitat CS.

Esplugues de Llobregat, 31 de març de 2016

Rafael Artuch

Raquel Montero

CAPÍTOL 1

CAPÍTOL 1: Estudi de l'estat del coenzim Q₁₀ en una cohort gran de pacients amb diagnòstic molecular definitiu

Respecte l'objectiu 1, s'han pogut estudiar 74 pacients amb diagnòstic etiològic procedents del nostre i d'altres centres europeus per tal d'establir la freqüència de les deficiències secundàries de CoQ₁₀ en diferents malalties i discutir els possibles mecanismes subjacents. El treball que presentem és fruit d'anys d'experiència en la valoració del CoQ₁₀ en multitud de pacients, per això és dels últims que hem realitzat. Així doncs, l'estudi representa el primer resultat, i l'exposem en forma de manuscrit, sotmès per publicació a la revista *Mitochondrion*.

Publicació 1

Títol: *Secondary CoQ deficiencies associated to mitochondrial and non mitochondrial diseases*

Autors:

Dèlia Yubero, Raquel Montero, Miguel A Martín, Julio Montoya, Antonia Ribes, Manuela Grazina, Iain P Hargreaves, Leonardo Salviati, Plácido Navas, Rafael Artuch and CoQ Working Goup

Referència:

Mitochondrion (sotmès a publicació)

Resum:

Hem avaluat els valors de CoQ₁₀ en 74 pacients amb diagnòstic etiològic definitiu, observant que la deficiència secundària de CoQ₁₀ és una troballa comú, tan en malalties que afecten al sistema OXPHOS com en malalties no mitocondrials. Un 44.6 % dels pacients presenta concentracions reduïdes de CoQ₁₀ en múscul i en fibroblasts, freqüència que es manté similar en els pacients amb malalties per deficiència d'OXPHOS o en malalties no relacionades amb el mitocondri. Un conjunt de malalties diverses apareixen representades en la cohort estudiada, però hem pogut observar que les síndromes de depleció del mtDNA són els desordres que s'associen amb més freqüència a la deficiència de CoQ₁₀. Confirmem l'associació de malalties que ja han estat descrites prèviament com a causants de deficiència secundària de CoQ₁₀ però també reportem noves relacions entre malalties i defecte de CoQ₁₀, com ara casos de defectes genètics en proteïnes mitocondrials –de transcripció de la maquinària del mtDNA i de components estructurals dels complexos de la CRM (*BSCL1*, *EARS2*, *NDUFS4*), on hipotetitzem que probablement existeixi un augment del recanvi del CoQ₁₀, el qual ja s'ha demostrat en diverses patologies mitocondrials (González-Mariscal et al., 2014); i també casos de malalties no mitocondrials (especialment rellevant un cas amb una canalopatia), on probablement la deficiència estaria causada per una alteració de la fracció de CoQ₁₀ extramitocondrial. La explicació dels mecanismes subjacents i dels

rols fisiopatològics de la deficiència secundària de CoQ₁₀ en aquestes malalties requerirà més investigacions.

Secondary coenzyme Q₁₀ deficiencies in mitochondrial and non-mitochondrial diseases

Delia Yubero^a, Raquel Montero^{a,b}, Miguel A. Martín^{b,c}, Julio Montoya^{b,d}, Antonia Ribes^{b,e}, Manuela Grazina^f, Eva Trevisson^g, Juan Carlos Rodríguez-Aguilera^{b,h}, Iain P Hargreavesⁱ, Leonardo Salvati^g, Plácido Navas^{b,h}, Rafael Artuch^{a,b}, and **CoQ deficiency study group**: Cristina Jou^{a,b}, Cecilia Jimenez-Mallebrera^{a,b}, Andres Nascimento^{a,b}, Belén Pérez-Dueñas^{a,b}, Carlos Ortez^a, Federico Ramos^a, Jaume Colomer^a, Mar O'Callaghan^{a,b}, Mercè Pineda^a, Angels García-Cazorla^{a,b}, Carmina Espinósⁱ, Angels Ruiz^k, Alfons Macaya^l, Anna Marcé-Grau^l, Judit Garcia-Villoria^{b,e}, Angela Arias^{b,e}, Sonia Emperador^{b,d}, Eduardo Ruiz-Pesini^{b,d}, Ester Lopez-Gallardo^{b,d}, Viruna Neerghenⁱ, Marta Simões^f, Luisa Diogo^m, Alberto Blázquez^{b,h}, Adrián González-Quintana^h, Aitor Delmiro^{b,h}, Cristina Domínguez-González^{b,h}, Joaquín Arenas^{b,h}, M^a Teresa García-Silva^{b,h}, Elena Martín^h, Pilar Quijada^h, Aurelio Hernández-Laín^h, María Morán^{b,h}, Eloy Rivas Infante^j, Rainiero Ávila Polo^j, Carmen Paradas López^j, Juan Bautista Lorite^j, Eva M. Martínez Fernández^j, Ana B. Cortésⁱ, Ana Sánchez-Cuesta^j, Maria V. Cascajo^{b,j}, María Alcázar^{b,j}, Gloria Brea-Calvo^{b,j}

^aInstitut de Recerca Pediàtrica-Hospital Sant Joan de Déu (IRP-HSJD), Barcelona, Spain.

^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Spain.

^cMitochondrial and Neuromuscular Disorders Group, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain.

^dDepartamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Spain.

^eIBC-Secció d'Errors Congènits del Metabolisme, Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

^fFaculty of Medicine, and Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Laboratory of Biochemical Genetics, Portugal.

^gClinical genetics Unit, Department of Woman and Child Health, IRP "Città della Speranza", Padova, Italy.

^hCentro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-CSIC and Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.

ⁱNeurometabolic Unit, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, Queen Square, London, UK.

^jGenetics and Genomics of Neuromuscular Disorders Unit, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain.

^kServicio de Neuropediatría, Hospital Son Espases, Palma de Mallorca, Spain.

^lPediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain.

^mHospital Pediátrico de Coimbra, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal.

Corresponding author:

Dr. Rafael Artuch

Clinical Biochemistry Department

Hospital Sant Joan de Déu and CIBERER

Passeig Sant Joan de Déu, 2

08950 Esplugues, Barcelona, Spain

E-mail: rantuch@hsjdbcn.org

Abstract

We evaluated the coenzyme Q₁₀ (CoQ) levels in patients who were diagnosed with mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) and non-OXPHOS disorders (n=74). Data from the 74 cases in this study revealed that 44.6% of patients showed low CoQ concentrations in either their skeletal muscle or skin fibroblasts. Our findings suggest that secondary CoQ deficiency is a common finding in OXPHOS and non-OXPHOS disorders. We hypothesize that cases of CoQ deficiency associated with OXPHOS defects could be an adaptive mechanism to maintain a balanced OXPHOS, although the mechanisms explaining these deficiencies and the pathophysiological role of secondary CoQ deficiency deserves further investigation.

Keywords: oxidative phosphorylation disorders; coenzyme Q₁₀; mitochondrial respiratory chain; muscle biopsy.

Abbreviations: Coenzyme Q₁₀ (CoQ), mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS), mitochondrial DNA (mtDNA), nuclear DNA (nDNA), citrate synthase (CS), mitochondrial respiratory chain enzymes (MRC).

1. INTRODUCTION

Coenzyme Q₁₀ (CoQ) is a lipid that plays a key role in mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) (Bentinger et al., 2010), but also displays other essential biological functions (Navas et al., 2007). CoQ deficiency has been associated with different clinical phenotypes and genetic conditions (Desbats et al., 2015). CoQ has a complex biosynthetic pathway, and the impairment of any of the proteins involved in this pathway can produce an alteration in intracellular CoQ levels, leading to a primary CoQ deficiency. Currently, it is known that 8 of the 13 *COQ* genes related to CoQ biosynthesis can cause human disease (Desbats et al., 2015), but these primary conditions are extremely rare. However, due to the intricate mechanisms and biological functions in which CoQ participates, and probably also due to its connection to other metabolic pathways, a secondary CoQ deficiency is a common feature among different diseases, such as mitochondrial OXPHOS disorders (Sacconi et al., 2010; Montero et al., 2013; Emmanuele et al., 2012), ataxia and oculomotor apraxia type I (Quinzii et al., 2005), multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (Gempel et al., 2007), cardiodiacutaneous syndrome (Aeby et al., 2007), methylmalonic aciduria (Haas et al., 2009) or mucopolysaccharidosys type III (Yubero et al., 2015) among others. Despite the higher incidence of secondary CoQ deficiencies, the mechanisms underlying these secondary defects remain unknown.

Our aim was to report the CoQ status in either the skeletal muscle or the cultured skin fibroblasts of 74 patients diagnosed with non-OXPHOS or OXPHOS diseases.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Subjects

We recruited 74 patients with a definitive etiological diagnosis (Supplementary table 1). In this cohort of patients, the muscle and/or the fibroblast samples were available because the initial clinical phenotype, biochemical, histopathological or neuroradiological findings suggested the presence of a mitochondrial disease (Morava et al., 2006). From this cohort, 3 patients were from the University of Coimbra, 2 were from the University College of London, 5 were from the Universidad

Pablo de Olavide (Sevilla), 8 were from the University of Padova, 9 were from the Hospital 12 de Octubre (Madrid) and 47 were from the Institut de Bioquímica Clínica and Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona).

The patients were classified into 2 groups according to the type of disease: Group 1 included 24 patients (age range: 14 days–37 years; average 8.7 years) with non-OXPHOS diseases; Group 2 included 50 patients (age range: 4 days–55 years; average 8.5 years) with a genetic diagnosis of a mitochondrial OXPHOS disease, of which 32 patients (group 2A; age range: 4 days–40 years; average 7.4 years) had a nuclear-encoded mitochondrial disease (including mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndromes) and 18 (group 2B; age range: 10 months–55 years; average 10.3 years) harboured a mtDNA point mutation, deletion or insertion.

2.2. Ethical issues

This study was approved by the Ethical Committees of the different centres involved. Patients and their parents signed an informed consent for genetic studies and the tissue samples from patients and controls were obtained according to the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2001.

2.3 Samples

Muscle biopsies (n=56) were processed following standard procedures for mitochondrial disease investigations (Montero et al., 2008). Skin biopsies (n=23) were cultured using standard procedures to obtain fibroblasts for the assessment of CoQ (Montero et al., 2008). Total DNA was isolated from the muscle, blood and urine depending on the clinical suspicion.

2.4 Biochemical and molecular studies

CoQ and mitochondrial respiratory chain enzymes (MRC): From Barcelona, Madrid, Coimbra, Padova and Sevilla's patients, the muscle and fibroblast CoQ levels were determined by reverse-phase high pressure liquid chromatography (HPLC, Waters, MA, USA) with electrochemical detection (ED; Coulochem II, ESA, MA, USA), as previously reported (Montero et al., 2008). Briefly, a nucleosil C-18 column (5 µm, 25 × 0.4 cm, Teknokroma, Barcelona, Spain) was used to separate CoQ. The mobile phase consisted of 20 mmol/L of lithium perchlorate in ethanol/methanol (40/60; v/v), and ED cells were attached at – 600 mV (conditioning

cell, Model 5021) and + 600 mV (analytical cell, Model 5010). The muscle CoQ status of patients from London was determined by HPLC with UV detection at 275 nm (Jasco UV 975 detector, Jasco, UK) with a similar composition of the mobile phase as detailed above (Duncan et al., 2005). The muscle and fibroblast CoQ levels were expressed as the nmol/g of total protein and for muscle samples, were also related to the CS activity (nmol/CS Units). The presence or absence of a CoQ deficient state in patients was identified in either muscle or fibroblast samples according to our own reference values that have been established in control populations (Montero et al., 2005). (Suppl Table 1). To minimize the potential variation of the different procedures for CoQ measurement, the percentage (%) of CoQ deficiency in relation to the lower limit of the reference values established in each laboratory involved in the study was calculated (Suppl Table 1).

The MRC and citrate synthase (CS) enzyme activities were determined in the muscle biopsies by spectrophotometric enzyme assays, as previously reported (Grazina et al., 2012; Spinazzi et al., 2011). The MRC enzyme activities were expressed as mU/CS Units and were classified as deficient compared to the reference intervals established in the different laboratories (Spinazzi et al., 2011; Duncan et al., 2005).

Genetic diagnosis: For suspected mtDNA induced diseases, whole mtDNA sequencing, detection of mtDNA rearrangements and/or the mtDNA content was measured by standard procedures. With

regard to the diseases caused by mutations in the nuclear genes, Sanger and NGS approaches (i.e., targeted and whole exome sequencing in some cases) were applied. In patients with a CoQ deficiency and a clinical phenotype suggestive of primary CoQ deficiency, the *COQ* genes were studied by Sanger and NGS with negative results.

2.5. Statistical analysis

The chi square test was applied to search for associations between the CoQ deficiency state and the OXPHOS and non-OXPHOS disease groups and also to explore the CoQ status with respect to normal or low specific MRC activities. Student's T-test was used to compare the percentage of CoQ deficiency in the patients from both disease groups and the OXPHOS disease groups (2A and 2B). Statistical significance was considered as $p < 0.05$. Calculations were performed with the SPSS 22.0 program.

3. RESULTS

The patient data are given in supplementary Table 1. Data from the 74 cases revealed that 44.6% (n = 33) had low CoQ concentrations in either their muscle or their fibroblasts. In the muscle samples, 33.9% (19 out of 56) had a CoQ deficiency related to their protein content and 6 additional cases showed a CoQ deficiency related to their CS activity. Regarding the fibroblast samples, 40.9% (9 out of 23) displayed a CoQ deficiency related to their protein content.

Similar rates of low CoQ values were detected in

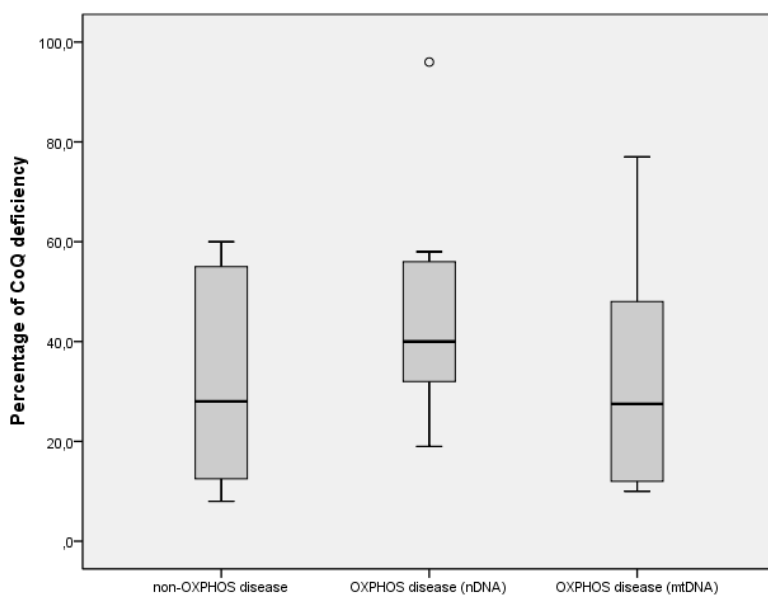


Figure 1: A box-plot representation of the percentage of CoQ deficiency in the 3 groups of patients. Overlapping values are observed, but the group of OXPHOS-disorders due to nuclear mutations (nDNA) displayed the highest median value regarding the percentage of CoQ deficiency. The heights of the boxes indicate the interquartile space (P25-P75); the horizontal lines in the boxes represent the median (P50). The circle indicates an outlier.

the non-OXPHOS disorder group (50% of cases: percentage of CoQ deficiency ranging from 8-60; Average 31.6, SD = 20.5) compared to the group of OXPHOS disorders (42% of cases; percentage of CoQ deficiency ranging from 10-96; median 42.0, SD = 20.9). When the disease groups were classified as 1) non OXPHOS disease, 2A) OXPHOS disease with mutations in the nuclear DNA (including mtDNA depletion) and 2B) OXPHOS disease with mutations in the mtDNA, statistical analysis did not reveal significant differences in the percentage of CoQ deficiency among groups, although group 2A displayed the highest percentage of CoQ deficiency (Figure 1). The most frequent disease group with CoQ deficient patients were the mitochondrial depletion syndromes. The chi square test showed an association between the presence of a CoQ deficiency and low succinate-cytochrome c reductase activity (CII+III, a CoQ dependent enzyme), but not with other MRC enzyme activities (Chi square = 5.61; $p = 0.031$). The group of OXPHOS disorders were the only patients in which low CII+III activities were observed ($n = 4$, CoQ deficiency ranging from 39-49 %). All of the non- OXPHOS patients displayed normal CII+III activities.

Three patients harboured only one mutation in the CoQ biosynthesis genes, and all of them presented with a muscle CoQ deficiency (Suppl Table 1). The individual who had a single mutation in *COQ4* displayed a decreased rate of CoQ biosynthesis in fibroblasts, while the subjects with *ADCK4* and *PDSS1* mutations showed normal CoQ biosynthesis, as previously reported (Buján et al., 2014).

4. DISCUSSION

A secondary CoQ deficiency appears to be a more common biochemical finding than a primary CoQ deficiency (Desbats et al., 2015). We observed here that 33 out of 74 cases displayed different degrees of CoQ deficiency, supporting these previous observations. Furthermore, a remarkable number of patients studied at the different centres over the years who presented with abnormal CoQ levels still have no genetic diagnosis (data not shown).

No association has been found between patients who have an OXPHOS or a non-OXPHOS disorder and those who have a CoQ deficiency, which could be explained by the location of CoQ both inside and outside of the mitochondria (Crane, 2007, Navas et

al., 2007) and by the different mechanisms that either down-regulate CoQ biosynthesis or increase CoQ turnover (Bentinger et al., 2010, González-Mariscal et al., 2014). It seems that the OXPHOS diseases, especially those that are due to nuclear DNA mutations, show a greater percentage of CoQ deficiency, although no significant differences were observed when we compared the different groups of disorders, possibly due to the cohort size. Decreased CII+III activity was the most sensitive MRC biomarker of CoQ deficiency (Montero et al., 2008), probably because the CoQ pool tends to be preferably reduced by complex I and secondly by complex II (Lapuente-Brun et al., 2013). Interestingly, CII+III deficiency was only shown in patients who had OXPHOS diseases and CoQ deficiency, which could in turn indicate that the CoQ pools at the extra-mitochondrial level may contribute to the CoQ alteration in non-OXPHOS patients. It is intriguing that the CII+III reduction was observed in cases in which the CoQ depletion ranged between 39 and 49 %, but not in patients with the most severe CoQ reduction (up to 90%), such as those found in the mtDNA depletion syndromes. In these diseases, CoQ deficiency is explained by a reduction in the mitochondrial number and volume, as an adaptive mechanism of the electron carrier level to the electron transport capacity of the complexes in the context of generalized mitochondrial dysfunction (Navarro-Sastre et al., 2012; Sacconi et al., 2010; Montero et al., 2013). Furthermore, a strong correlation has been found between the CoQ and the citrate synthase activities in a cohort of patients with mtDNA depletion syndromes (Montero et al., 2013), and this fact could explain the relative correction of CII+III activity as related to CS activity.

Regarding the tissue type and biochemical evaluation, similar rates of CoQ deficiency were observed for both the muscle and fibroblasts. Skeletal muscle is considered to be the gold standard sample for these types of studies because it allows for the analysis of other biomarkers, such as those derived from histopathological studies. Fibroblasts have the advantage of performing functional studies, such as uridine biosynthesis, reactive oxygen species production and CoQ biosynthesis analysis, which have all been demonstrated to be extremely useful tools for discriminating between primary and secondary

CoQ deficiencies (López-Martín et al., 2007, Quinzii et al., 2008, Bujan et al., 2014). In any case, the smaller percentage of CoQ deficiencies detected in our cases probably does not have a direct impact on the MRC enzyme activity, but it might be deleterious for other biological functions, such as antioxidant defences and DNA metabolism, or may simply be an epiphenomenon without pathophysiological relevance.

We observed a CoQ deficiency in a wide spectrum of diseases (Suppl Table 1). For the group with an mtDNA depletion syndrome, this was especially relevant (Montero et al., 2013). Low CoQ levels were also observed in those who had mitochondrial diseases due to mtDNA point mutations (2 patients with tRNA^{Trp} mutations, 2 patients with tRNA^{Leu}, 1 mtDNA single large-scale deletion and 1 mtDNA small insertion); in nuclear encoded mitochondrial disorders, such as multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency (2 patients); and in other diseases, such as apraxia with oculomotor ataxia and Friedreich's ataxia, supporting some of the published evidence (Sacconi et al., 2010; Gempel et al., 2007; Quinzii et al., 2005; Cooper et al., 2008). However, decreased levels of CoQ seemed not to be a consistent feature in some of these conditions (Desbats et al., 2015) given that patients who had the same disease were found to have both normal or reduced CoQ levels (Suppl Table 1).

A CoQ deficiency was detected in other mitochondrial diseases that were not previously associated with the CoQ status. The alteration of key mitochondrial pathways could directly or indirectly affect the CoQ status, as we observed in three different cases: *BCSL1*, which codes for a protein participating in MRC complex III assembly; *EARS2*, which is an aminoacyl-tRNA synthetase causing a combined oxidative phosphorylation deficiency; and *NDUFS4*, which is a MRC complex I subunit defect. No explanation is available at the present time, but it is possible that an increased rate of CoQ turnover may occur as a general mechanism across the different mitochondrial disorders.

Interestingly, non-OXPHOS diseases may present with a CoQ deficiency. In Niemann-Pick C, a reduction of CoQ biosynthesis seems to be due to the accumulation of cholesterol because it may down-regulate HMG-CoA reductase, decreasing

mevalonate and, consequently, reducing CoQ synthesis (Turunen et al., 2004; Bujan et al., 2014). Our 2 cases presented with a low-normal CoQ status in their fibroblasts when related to their protein content, but were clearly low when related to the CS activity (Bujan et al., 2014). These authors also demonstrated a normal rate of CoQ biosynthesis with mevalonate as its precursor, although it was decreased using para-hydroxybenzoate, which is to be expected if the mevalonate pathway is partially inhibited (Bujan et al., 2014). A striking finding was one case with a channelopathy (*SCN2A*) that presented a 35% deficiency in CoQ from the muscle. *SCN2A* encodes a voltage gated sodium channel (Nav1.1) that participates in the generation and propagation of action potentials in neurons and muscle cells, and mutations in this gene are linked to a wide range of seizure disorders (Howell et al., 2015). Despite the lack of data about MRC dysfunction in cases of a *SCN2A* mutation, a role for the CoQ in calcium signalling was postulated with the identification of mutations in *ANO10*, a member of a chloride channel family of proteins (Balreira et al., 2014). This work opens a new avenue for elucidating some aspects of secondary CoQ deficiency pathophysiology.

Despite not have a definitive diagnosis yet, we also included three patients in the present study who had mutations in only one allele of *COQ4*, *ADCK4* and *PDSS1* genes (Suppl Table 1). All three presented with different degrees of CoQ deficiency in their muscle tissue, but only the case with one mutation in *COQ4* presented with a reduction in CoQ biosynthesis in the fibroblasts (Bujan et al., 2014). This may be explained by the fact that a recessive *COQ4* defect is a very severe condition, and thus, only one allelic modification of the *COQ4* gene may be needed to cause a reduction in CoQ biosynthesis (Salviati et al., 2012). Both the single mutations observed in the *ADCK4* and *PDSS1* genes are probably not related to the CoQ deficiency, supporting the recessive nature of primary CoQ deficiency syndromes.

5. CONCLUSIONS

In conclusion, secondary CoQ deficiency is a common finding in mitochondrial and non-mitochondrial disorders. We propose that CoQ deficiency can be part of the pathophysiology, but can also be an adaptive mechanism for OXPHOS

homeostasis. The elucidation of the mechanisms underlying these deficiencies and the pathophysiological role for secondary CoQ deficiency deserves further investigation, especially because some of these patients may benefit from CoQ therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS: PI12/01683, PI14/00005, PI14/00028 and PI14/01962), the Explora Ciencia program, the Departamento de Ciencia, Tecnología, from Universidad del Gobierno de Aragón [Grupos Consolidados B33], the FEDER Funding Program from the European Union. The CIBERER is an initiative of the ISCIII. UCLH/UCL received a proportion of funding from the Department of Health sNIHR Biomedical Research Centres funding scheme.

REFERENCES

- Aeby A, Sznajder Y, Cavé H, et al. Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome associated with muscular coenzyme Q10 deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30(5):827.
- Balreira A, Boczonadi V, Barca E, et al. ANO10 mutations cause ataxia and coenzyme Q₁₀ deficiency. *J Neurol* 2014; 261(11):2192-8. doi: 10.1007/s00415-014-7476-7.
- Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396(1):74-9.
- Buján N, Arias A, Montero R, et al. Characterization of CoQ10 biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ10 deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2014; 37(1):53-62. doi: 10.1007/s10545-013-9620-4.
- Cooper JM, Korlipara LV, Hart PE, et al. Coenzyme Q10 and vitamin E deficiency in Friedreich's ataxia: predictor of efficacy of vitamin E and coenzyme Q10 therapy. *Eur J Neurol* 2008; 15(12):1371-9. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02318.x.
- Crane FL. Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion* 2007; 7 Suppl:S2-7.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000;15(1):7-12.
- Desbats MA, Lunardi G, Doimo M, et al. Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ 10) deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38(1):145-56. doi: 10.1007/s10545-014-9749-9.
- Duncan AJ, Heales SJR, Mills K, et al. Determination of coenzyme Q10 in blood mononuclear cells, skeletal muscle and plasma by HPLC using di-propoxy-coenzyme Q10 as an internal standard. *Clin Chem* 2005; 51(12):2380-2.
- Emmanuele V, López LC, Berardo A, et al. Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review. *Arch Neurol* 2012; 69(8):978-83. doi: 10.1001/archneurol.2012.206.
- Gempel K, Topaloglu H, Talim B, et al. The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Brain* 2007; 130(Pt 8):2037-44.
- González-Mariscal I, García-Testón E, Padilla S, et al. The regulation of coenzyme q biosynthesis in eukaryotic cells: all that yeast can tell us. *Mol Syndromol* 2014; 5(3-4):107-18. doi: 10.1159/000362897.
- Grazina M. Mitochondrial respiratory chain: biochemical analysis and criterion for deficiency in diagnosis. *Methods Mol Biol* 2012; 837:73-91. doi: 10.1007/978-1-61779-504-6_6.
- Haas D, Niklowitz P, Hörster F, et al. Coenzyme Q(10) is decreased in fibroblasts of patients with methylmalonic aciduria but not in mevalonic aciduria. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32(4):570-5. doi: 10.1007/s10545-009-1150-8.
- Howell KB, McMahon JM, Carvill GL, et al. SCN2A encephalopathy: A major cause of epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Neurology* 2015; 85(11):958-66. doi: 10.1212/WNL.0000000000001926.
- Lapiente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 2013 Jun 28;340(6140):1567-70.
- López-Martín JM, Salviati L, Trevisson E, et al. Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis. *Hum Mol Genet* 2007 May 1;16(9):1091-7.
- Montero R, Artuch R, Briones P, et al. Muscle coenzyme Q10 concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders. *Biofactors* 2005; 25:109-15.
- Montero R, Sánchez-Alcázar JA, Briones P, et al. Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin Biochem* 2008; 41:697-700.
- Montero R, Grazina M, López-Gallardo E, et al. Coenzyme Q10 deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion* 2013; 13(4):337-41. doi: 10.1016/j.mito.2013.04.001.
- Morava E, van den Heuvel L, Hol F, et al. Mitochondrial disease criteria: diagnostic applications in children. *Neurology* 2006; 67(10):1823-6.
- Navarro-Sastre A, Tort F, Garcia-Villoria J, et al. Mitochondrial DNA depletion syndrome: new descriptions and the use of citrate synthase as a helpful tool to better characterise the patients. *Mol Genet Metab* 2012; 31(107):409-15.
- Navas P, Villalba JM, de Cabo R. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion* 2007;7 Suppl:S34-40.
- Quinzii CM, Kattah AG, Naini A, et al. Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology* 2005; 64(3):539-41.
- Quinzii CM, López LC, Von-Moltke J, et al. Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J*

2008;22(6):1874-85. doi: 10.1096/fj.07-100149.

Sacconi S, Trevisson E, Salviati L, et al. Coenzyme Q10 is frequently reduced in muscle of patients with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul Disord* 2010; 20(1):44-8. doi: 10.1016/j.nmd.2009.10.014.

Salviati L, Trevisson E, Rodriguez Hernandez MA, et al. Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *J Med Genet* 2012; 49(3):187-91. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100394.

Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, et al. Optimization of respiratory chain enzymatic assays in muscle for the diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2011; 11(6):893-904. doi: 10.1016/j.mito.2011.07.006.

Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1660(1-2):171-99.

Yubero D, Montero R, O'Callaghan M, et al. Coenzyme Q10 and Pyridoxal Phosphate Deficiency Is a Common Feature in Mucopolysaccharidosis Type III. *JIMD Rep* 2015 Jul 24. [Epub ahead of print]

Supplementary Table 1: The patients are distributed by disease group (non-OXPPOS disease (1); OXPPOS disease due to nDNA-encoded proteins (2A) or mtDNA-encoded proteins (2B)) and diagnosis (disease OMIM and causative gene if available). Molecular diagnosis or other diagnostic parameters are also stated: mutations are defined at cDNA or protein level depending on the case (square brackets represent one allele, therefore the homozygous or heterozygous state is implied; mutation nomenclature is represented according to HGVS recommendations (den Dunnen and Antonarakis, 2000)). CoQ deficient status (values and percentage of reduction) in tissues analyzed are shown. For each patient, a qualitative deficient was defined (1=normal CoQ; 2=low CoQ) when presenting reduced CoQ in any of the different tissues (in muscle or in fibroblasts) or calculations (related to protein or CS). A good agreement is observed regarding reference values for muscle and fibroblasts CoQ in the different centers (see end of the table).

CASE	DISEASE GROUP	DIAGNOSIS	DNA MUTATIONS AND OTHER FINDINGS	Muscle CoQ (nmol/g prot)	% CoQ deficiency	Fibroblasts CoQ (nmol/g prot)	% CoQ deficiency
1	1	Aicardi-Goutières syndrome	Clinical and radiological diagnosis	44	60		
2	1	Aicardi-Goutières syndrome	Clinical and radiological diagnosis	87	21		
3	1	Ataxia-oculomotor apraxia syndrome	APT _X : p.[(Trp279Ter)];(Trp279Ter)]	255			
4	1	Ataxia-oculomotor apraxia syndrome	APT _X : c.[875-1G>A];[875-1G>A]			42	13
5	1	Carbamoylphosphate synthetase I deficiency	CPS _I : p.[(Arg850Leu)] (under investigation)			47	
6	1	Cardiofaciocutaneous syndrome	BRAF: p.[(Phe595Leu)]	307			
7	1	Carnitine palmitoyltransferase II deficiency	CPT ₂ : p.[(His242ProfsTer12)];(Ile502Thr)]			52	
8	1	Carnitine palmitoyltransferase II deficiency	CPT ₂ : c.[338C>T];[725_726delAC]	205			
9	1	Caveolinopathy	Immunohistochemistry	136	55		
10	1	Central core myopathy	Compatible histology (genetic analysis in course)	135	55		
11	1	Charcot Marie Tooth	MPZ: c.[293G>A]	170			
12	1	Costello syndrome	HRAS: c.[Gly12Ser]	116	17		
13	1	Early infantile epileptic encephalopathy	ARX: c.[196G>A]	162			
14	1	Epileptic encephalopathy	SCN2A: c.[2687C>T]	71	35		
15	1	Friedreich's ataxia	FXN: c.[(GAA) ₇₅₀];[(GAA) ₉₅₀]	50	55		
16	1	GLUT-1 deficiency syndrome	SLC2A1: c.[18+2T>G]	76	31		
17	1	Myopathy with lactic acidosis	ISCU: two heterozygous mutations (a frameshift plus a missense, not available for publication)	975			

18	1	Niemann-Pick type C	<i>NPCI</i> : p.[(Asn916del)];[(Ala1151Thr)]				47	18
19	1	Niemann-Pick type C	<i>NPCI</i> : p.[(Arg978Cys)];[(Phe995Leu)]	100	9		50	
20	1	Primary microcephaly	<i>CASC5</i> : c.[6427G>T];[1599A>G]	154	8 (CS)			
21	1	Pyruvate dehydrogenase E1-alpha deficiency	<i>PDHAI</i> : c.[832G>A]	488				
22	1	Pyruvate dehydrogenase E1-beta deficiency	<i>PDHBE</i> : c.[42+1G>A];[301A>G]	838				
23	1	SALLA disease	<i>SLC17A5</i> : c.[918T>G];[1239C>G]	97	12			
24	1	Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	<i>ACADVL</i> : p.[(Val283Ala)];[(Ser583Leu)]				55	
25	2A	Combined oxidative phosphorylation deficiency	<i>EARS2</i> : c.[319C>T];[322C>T]				35	28
26	2A	Combined oxidative phosphorylation deficiency	<i>FARS2</i> : c.[1256G>A]; [(772+1_773-1)_(904+1_905-1)del]	229				
27	2A	Congenital ataxia	17q21.31 deletion	174				
28	2A	CoQ deficiency syndrome	<i>COQ4</i> : p.[(Glu161Asp)]	125	57 (CS)		55	
29	2A	CoQ deficiency syndrome	<i>COQ8</i> : p.[(Leu609Val)]	56	49		48	
30	2A	CoQ deficiency syndrome	<i>PDSS1</i> : p.[(Ala380Thr)]	95	14		29	40
31	2A	Cytochrome c oxidase deficiency	<i>SCO2</i> : p.[(Glu140Lys)];[(Met63fsTer74)]				102	
32	2A	Infantile liver failure, tRNA methyltransferase	<i>TRMU</i> : two heterozygous mutations (evaluating pathogenicity)				94	
33	2A	Leigh syndrome	NGS in course	238				
34	2A	Leigh syndrome	NGS in course	222				
35	2A	Leigh syndrome	<i>NDUFS4</i> : c.[(291delG)]	144	19 (CS)			
36	2A	Leigh syndrome due to CIII deficiency	<i>BCSL1</i> : p.[(R56X)];[(R69C)]	143	33 (CS)			
37	2A	Leigh syndrome due to COX IV deficiency	<i>SURF1</i> : c.[326insATdelTCTGCCAGCC]; [326insATdelTCTGCCAGCC]				64	
38	2A	Mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia	<i>PUS1</i> : p.[(Ile163LeufsTer4)];[(Arg295Gln)]				124	
39	2A	mtDNA depletion syndrome	Possible mtDNA depletion (validation in course)	276				
40	2A	mtDNA depletion syndrome	90% (nuclear gene analysis in course)	46	58			
41	2A	mtDNA depletion syndrome	75-80% (nuclear gene analysis in course)	78	29			

42	2A	mtDNA depletion syndrome		73% (nuclear gene analysis in course)	50	55		
43	2A	mtDNA depletion syndrome		75% (nuclear gene analysis in course)	132			
44	2A	mtDNA depletion syndrome		90% (nuclear gene analysis in course)	67	39		
45	2A	mtDNA depletion syndrome		94% (nuclear gene analysis in course)	222			
46	2A	mtDNA depletion syndrome		99% (nuclear gene analysis in course)	129	39 (CS)		
47	2A	mtDNA depletion syndrome		72 % (nuclear gene analysis in course)	131			
48	2A	mtDNA depletion syndrome		<i>FBXL4</i> : c.[851delC];[851delC]	4	96		
49	2A	mtDNA depletion syndrome		<i>MPV17</i> : c.[461+G>C];[461+G>C]	151			
50	2A	mtDNA depletion syndrome		<i>SUCLA2</i> : c.[1048G>A];[1049G>T]	82	25		
51	2A	Multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency		<i>ETFB</i> : p.[(Cys42Arg)];[(Lys202del)]		26	54	
52	2A	Multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency		<i>ETFDH</i> : two pathogenic mutations		121		
53	2A	Multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency		<i>ETFDH</i> : heterozygous missense mutation (unpublished, currently in NGS studies)	390			
54	2A	Multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency		<i>ETFDH</i> : p.[(Gln14HisfsTer1)];[(Phe260Ser)]		20	65	
55	2A	Multiple mitochondrial dysfunctions syndrome		<i>NFU1</i> : c.[545+5G>A];[622G>T]	140			
56	2A	Myopathy with multiple mtDNA deletions		<i>POLG</i> : novel heterozygous mutation with family segregation	238			
57	2B	NARP (ATP synthase deficiency)		<i>MT-ATP6</i> : m.8993T>G	269			
58	2B	Leigh syndrome (ATP synthase deficiency)		<i>MT-ATP6</i> : m.8993T>G	173			
59	2B	Leigh syndrome / NARP (complex I, subunit 5)		<i>MT-ND5</i> : m.13513G>A	174			
60	2B	MELAS (subunit 5 of complex I)		<i>MT-ND5</i> : m.13513G>A	209	98		
61	2B	MELAS (tRNA ^{LEU(UUR)})		<i>MT-TL1</i> : m.3243A>G	489			
62	2B	MELAS (tRNA ^{LEU(UUR)})		<i>MT-TL1</i> : m.3243A>G		21	77	
63	2B	MELAS (tRNA ^{LEU(UUR)})		<i>MT-TL1</i> : m.3243A>G;3229_3230insA		31	45	
64	2B	MERRF like (tRNA ^{VAL})		<i>MT-TV</i> : m.1643A>G (unknown pathogenesis)	485			
65	2B	Mitochondrial encephalopathy (tRNA ^{TRP})		<i>MT-TW</i> : m.5514A>G	206	10 (CS)		

66	2B	Mitochondrial encephalopathy (tRNA ^{TRP})	MT-TW: m.5545C>T			84	12
67	2B	Infantile optic atrophy, nistagmus and cerebellar ataxia	MT-CYB: m.15853C>A homoplasmic (100%) (unknown pathogenesis)			65	
68	2B	Kearns-sayre syndrome (mtDNA deletions)	single mtDNA deletion (6331-13994), heteroplasmic (66%)	456			
69	2B	Kearns-sayre syndrome (mtDNA deletions)	single mtDNA deletion (8483-13459), heteroplasmic (62%)	128			
70	2B	mtDNA deletion syndrome	single mtDNA deletion (7.8Kb), heteroplasmic (36%)	347			
71	2B	mtDNA deletion syndrome	single mtDNA deletion (5.0Kb), heteroplasmic (50%)	157	48		
72	2B	mtDNA deletion syndrome	multiple mtDNA deletions	1253			
73	2B	mtDNA deletion syndrome	multiple mtDNA deletions	128			
74	2B	mtDNA insertion	mtDNA insertion (validation in course)			33	21

Reference values for muscle and fibroblasts COQ in the different centers. A good agreement is observed.

Muscle

University College of London: 140-580 nmol/g protein

Hospital Sant Joan de Déu: 110-480 nmol/g protein

Fibroblasts

Pablo de Olavide (Sevilla): 42-108 nmol/g protein

Institut de Bioquímica Clínica: 57-87 nmol/g protein

Hospital Sant Joan de Déu: 48-112 nmol/g protein

CAPÍTOL 2

CAPÍTOL 2: Identificar noves causes d'alteracions de l'estat del coenzim Q₁₀, plantejant aspectes fisiopatològics i terapèutics

L'increment en la descripció de malalties amb alteració secundària de l'estat del CoQ₁₀ és important per la possible implicació en les seves bases fisiopatològiques, així com per plantejar la suplementació oral de CoQ₁₀ en malalties que en la major part dels casos són greus i no disposen d'un tractament efectiu. En aquest sentit, hem identificat tres causes secundàries d'alteració de l'estat del CoQ₁₀ que es descriuen en tres articles publicats en revistes científiques.



- 13 Quintana E, Mayr JA, García Silva MT *et al*: PDH E1 β deficiency with novel mutations in two patients with Leigh syndrome. *J Inherit Metab Dis* 2009; **32**(Suppl 1): S339–S343.
- 14 Montero R, Grazina M, López-Gallardo E *et al*: Coenzyme Q₁₀ deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion* 2013; **13**: 337–341.
- 15 Barros MH, Johnson A, Gin P, Marbois BN, Clarke CF, Tzagoloff A: The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *J Biol Chem* 2005; **280**: 42627–42635.
- 16 Glushakova LG, Judge S, Cruz A, Pourang D, Mathews CE, Stacpoole PW: Increased superoxide accumulation in pyruvate dehydrogenase complex deficient fibroblasts. *Mol Genet Metab* 2011; **104**: 255–260.
- 17 Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL *et al*: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* 2004; **65**: 1238–1247.
- 18 Winski SL, Koutalos Y, Bentley DL, Ross D: Subcellular Localization of NAD(P)H:quinone Oxidoreductase 1 in Human Cancer Cells. *Cancer Res* 2002; **62**: 1420–1424.
- 19 Gomes AP, Price NL, Ling AJY *et al*: Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* 2013; **155**: 1624–1638.

Publicació 3

Títol:

Association between coenzyme Q10 and glucose transporter (GLUT1) deficiency

Autors:

Dèlia Yubero, María M O'Callaghan, Raquel Montero, Aida Ormazábal, Judith Armstrong, Carmen Espinós, María Angeles Rodríguez, Cristina Jou, Esperanza Castejón, MA Aracil, MV Cascajo, Angela Gavilán, Paz Briones, Cecilia Jimenez-Mallebrera, Mercedes Pineda, Plácido Navas, Rafael Artuch.

Referència:

BMC Pediatrics 2014 Nov 8;14:284.

Resum:

En la síndrome de deficiència de GLUT-1 (G1DS), el transport de glucosa a través de la barrera hematoencefàlica es veu afectat en haploinsuficiència per mutacions en el gen *SLC2A1*, codificador del transportador. Descriuim una pacient amb atàxia, nistagmus, disàrtria i epilèpsia mioclònica en la que la sospita de malaltia mitocondrial i el diagnòstic inicial de deficiència de CoQ₁₀ guia la història clínica fins la confirmació del diagnòstic definitiu de G1DS. Previ al diagnòstic de G1DS i, per tant, previ al tractament de la malaltia amb dieta cetogènica que va implicar una millor recuperació clínica en la pacient, la suplementació amb CoQ₁₀ va produir una millora clínica de les manifestacions cerebel·loses (atàxia, disàrtria i nistagmus). El diagnòstic del defecte G1DS es va fer atès que la epilèpsia, un dels signes més importants de la malaltia, no es va resoldre després de l'administració de CoQ₁₀. Posteriorment a la realització d'una punció lumbar, es va objectivar un descens del valor de glucosa en LCR, amb la posterior identificació d'una mutació al gen *SLC2A1*. Aquest cas ens suggereix que la reducció dels valors de CoQ₁₀ podria estar tenint un efecte modificador de la clínica dels pacients amb G1DS. Estudis funcionals en fibroblasts reforcen el paper potencial de la deficiència de CoQ₁₀ en la patogenicitat de la malaltia. En conclusió, encara que sembla que la dieta cetogènica corregeix una part important de les conseqüències clíniques de la

deficiència de GLUT1, el tractament coadjuvant amb CoQ₁₀ podria assajar-se si es corroboressin aquestes troballes en altres pacients, especialment degut a que la dieta cetogènica és actualment insuficient com a tractament aïllat de la malaltia, sent, a més a més, de difícil compliment.

CASE REPORT

Open Access

Association between coenzyme Q₁₀ and glucose transporter (GLUT1) deficiency

Delia Yubero¹, Mar O'Callaghan¹, Raquel Montero¹, Aida Ormazabal¹, Judith Armstrong¹, Carmina Espinos², Maria A Rodríguez¹, Cristina Jou¹, Esperanza Castejon¹, Maria A Aracil¹, Maria V Cascajo³, Angela Gavilan³, Paz Briones⁴, Cecilia Jimenez-Mallebrera¹, Mercedes Pineda¹, Plácido Navas³ and Rafael Artuch^{1*}

Abstract

Background: It has been demonstrated that glucose transporter (GLUT1) deficiency in a mouse model causes a diminished cerebral lipid synthesis. This deficient lipid biosynthesis could contribute to secondary CoQ deficiency. We report here, for the first time an association between GLUT1 and coenzyme Q₁₀ deficiency in a pediatric patient.

Case presentation: We report a 15 year-old girl with truncal ataxia, nystagmus, dysarthria and myoclonic epilepsy as the main clinical features. Blood lactate and alanine values were increased, and coenzyme Q₁₀ was deficient both in muscle and fibroblasts. Coenzyme Q₁₀ supplementation was initiated, improving ataxia and nystagmus. Since dysarthria and myoclonic epilepsy persisted, a lumbar puncture was performed at 12 years of age disclosing diminished cerebrospinal glucose concentrations. Diagnosis of GLUT1 deficiency was confirmed by the presence of a *de novo* heterozygous variant (c.18+2T>G) in the *SLC2A1* gene. No mutations were found in coenzyme Q₁₀ biosynthesis related genes. A ketogenic diet was initiated with an excellent clinical outcome. Functional studies in fibroblasts supported the potential pathogenicity of coenzyme Q₁₀ deficiency in GLUT1 mutant cells when compared with controls.

Conclusion: Our results suggest that coenzyme Q₁₀ deficiency might be a new factor in the pathogenesis of G1D, although this deficiency needs to be confirmed in a larger group of G1D patients as well as in animal models. Although ketogenic diet seems to correct the clinical consequences of CoQ deficiency, adjuvant treatment with CoQ could be trialed in this condition if our findings are confirmed in further G1D patients.

Keywords: Glucose transporter type I deficiency, *SLC2A1* gene, Coenzyme Q₁₀, Ataxia, Ketogenic diet

Background

GLUT1 deficiency syndrome (G1D) most often causes infantile-onset refractory epilepsy, cognitive impairment and motor abnormalities (ataxia, dystonia, chorea or dyskinesia) [1-4]. The main pathophysiological mechanism of the disease is associated with impaired glucose transport across the blood brain barrier and through astrocyte cell membranes that are haploinsufficient in the GLUT1 glucose carrier encoded by the *SLC2A1* gene [5,6]. However

it is unclear how decreased glucose flux leads to the manifestations of the disorder.

G1D is a partially treatable condition with ketogenic diet (KD), which can replace glucose for acetyl-CoA generation [7,8]. Energy failure has been proven in G1D astrocytes, while tricarboxylic acid abundance in the brain of G1D mouse model is normal. These findings support the complementary or alternative view that additional mechanisms participate in disease pathogenesis, placing new emphasis on G1D as a glial disease [9]. This contention is highlighted by the preliminary therapeutic efficacy of triheptanoin, a dietary supplement with the potential to stimulate cerebral anabolism and energy delivery [10].

Coenzyme Q₁₀ (CoQ) is a lipidic electron carrier in the mitochondrial respiratory chain (MRC). One of the essential substrates for CoQ generation is acetyl-CoA

* Correspondence: rantuch@hsjdbcn.org

¹Clinical Biochemistry, Pediatric Neurology, Histopathology, Gastroenterology-Nutrition and Neuromuscular Unit Departments. Hospital Sant Joan de Déu and Centre For research in rare diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

[11]. Mutations in genes involved in the CoQ biosynthesis pathway are associated with different clinical phenotypes, being cerebellar ataxia the most common one [11]. However, “secondary” CoQ deficiency is also characteristic of other diseases, since CoQ biosynthesis involves an intricate, broad set of reactions that may be potentially impacted by “primary” disturbance of several biochemical processes [12].

Our aim is to describe, for the first time a relevant association between G1D and CoQ deficiency. Clinical, biochemical, molecular and therapeutic observations constitute the basis of this association.

Case presentation

The proband is a 15-years old girl with an unremarkable family history. At 18 months old she manifested no ambulation, and by 3 years old she had developed ataxia and epilepsy with normal neuroimaging. At 5 years old clinical examination showed axial hypotonia, truncal ataxia, limb dysmetria and hyperreflexia. Paroxysmal nystagmus, saccadization of visual pursuit and dysarthria were observed. The patient also exhibited intellectual disability (IQ = 54).

Biochemical analyses in blood disclosed elevated lactate in 3 separate occasions and elevated alanine in 12 determinations (Table 1). Muscle and skin biopsies were analyzed at 8 years of age to search for mitochondrial

disorders. CoQ deficiency was identified both in muscle and fibroblasts (see Results). Because of this finding, CoQ supplementation (orally administered at 30 mg/Kg/day) was initiated. Ataxia improved dramatically after 6 months of therapy, and, upon reassessment after 4 years of CoQ treatment, ambulation remained essentially normal, with a mild residual reduction in velocity. Her nystagmus had also disappeared and her visual pursuit had normalized [13]. However, mild dysmetria, dysarthria, myoclonic epilepsy and intellectual disability (perhaps refractory to CoQ), were present. During CoQ therapy, concomitant treatment with valproate and ethosuximide was given to control myoclonic epilepsy. No noticeable side-effects were observed when antiepileptic doses were raised to maintain therapeutic levels along the evolution of the disease due to the patient increasing weight. In order to further investigate these manifestations, a lumbar puncture was performed at 12 years of age, revealing diminished cerebrospinal glucose concentrations (Table 1). Plasma glucose concentration was normal. Diagnosis of GLUT1 deficiency (G1D) was established and a ketogenic diet (4:1 ratio, containing medium chain triglyceride oil) was initiated (CoQ treatment was then discontinued).

Written informed consent was obtained from the parents. The study was approved by the Ethical Committee of our Hospital.

Table 1 Main biochemical findings in a case with GLUT1 and CoQ deficiency

	Patient	Reference values
Blood		
Lactate	1.8-2.6 (2.2)	0.5-1.7 mmol/L
Alanine	300-691 (560)	150-270 μmol/L
Cholesterol	4.0	< 5.2 mmol/L
CoQ (baseline)	0.33	0.45-1.1 μmol/L
CoQ (after treatment)	3.9-7.8 (5.5)	0.45-1.1 μmol/L
Cerebrospinal fluid		
Glucose	1.9	2.2-3.4 mmol/L
Lactate	1.07	1.1-2.2 mmol/L
Muscle biopsy		
CoQ content	76	115-450 nmol/g protein
Complex I + III*	149	107-560 mU/citrate synthase U
Complex II + III*	82	75-149 mU/citrate synthase U
Fibroblast		
CoQ content (incubated with glucose)	78	100-150 nmol/g protein
CoQ content (incubated with galactose)	123	100-150 nmol/g protein

Patient results from blood are expressed as range (median).

*Complex I + III: NADH:cytochrome C oxidoreductase. Complex II + III: succinate: cytochrome C oxidoreductase.

Laboratory investigations

Muscle and skin biopsies were collected, stored and cultured following previously reported procedures [14]. CoQ content was analyzed by HPLC with electrochemical detection, and MRC enzyme activities by spectrophotometry as reported [14].

Functional studies in fibroblasts: Human Dermal Fibroblasts (HDF) were grown in Dulbecco’s modified essential medium as previously reported [15]. Cells were grown with 1 g/L of either glucose or galactose from plating and throughout the entire duration of the observation period. Mycoplasma testing was negative. Also normal and G1D fibroblasts were supplemented with 30 μmol/L CoQ. Growth rate was analyzed as indicated [15].

Molecular analysis of genomic DNA (gDNA) isolated from blood included Sanger sequencing of 12 genes involved in CoQ biosynthesis (*ADCK3*, *ADCK4*, *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ3*, *COQ4*, *COQ5*, *COQ6*, *COQ9*, *CQ10A* and *COQ10B*), in addition to the *SLC2A1* gene, which encodes for GLUT1 transporter. *In silico* mutation analysis was done by the Mutation Taster software.

Total RNA was isolated from control and patient’s fibroblast cultures with RNeasy Fibrous Tissue mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). 1 μg of RNA was retro-transcribed with GoTaq* Probe 2-Step for RT-PCR (Promega, Wisconsin, USA) to obtain cDNA. *SLC2A1* mRNA transcripts were studied on cDNA through PCR amplification with specific

primers located in exon 1 (available on request), followed by direct sequencing.

Results

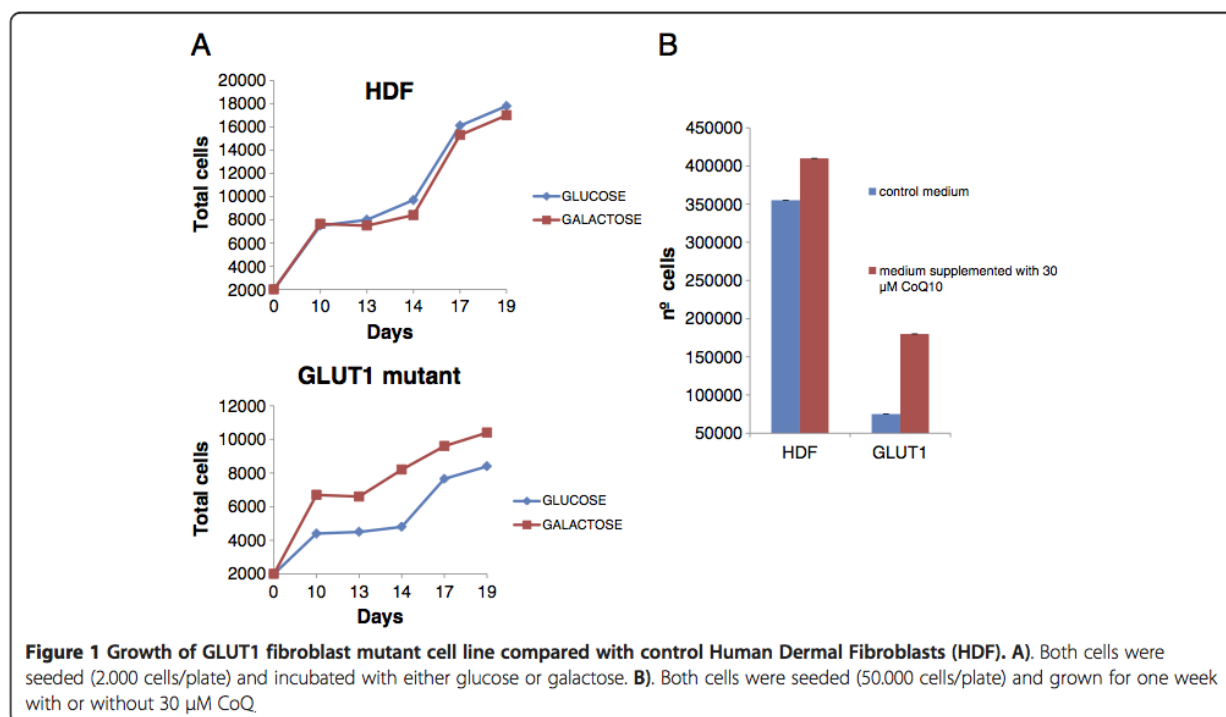
Muscle and fibroblasts CoQ content was decreased (Table 1). Functional studies of cell viability in culture with either glucose or galactose are illustrated in Figure 1A. The GLUT1 mutant cell line cultured in the presence of glucose displayed significantly decreased growth rate when compared with cultures grown in medium with galactose. Furthermore, the control cell line growth rate was significantly greater than those observed for the GLUT1 mutant line when cultured in glucose-containing medium. CoQ content was increased in GLUT1 mutant fibroblasts after 10 days growth in galactose (Table 1) while it remained unchanged in fibroblasts incubated in glucose media for the same length of time. CoQ supplementation of patient's fibroblasts for one week induced an increase of 37% cell growth rate while the growth rate of control cells with the same treatment only increased by 15% (Figure 1B).

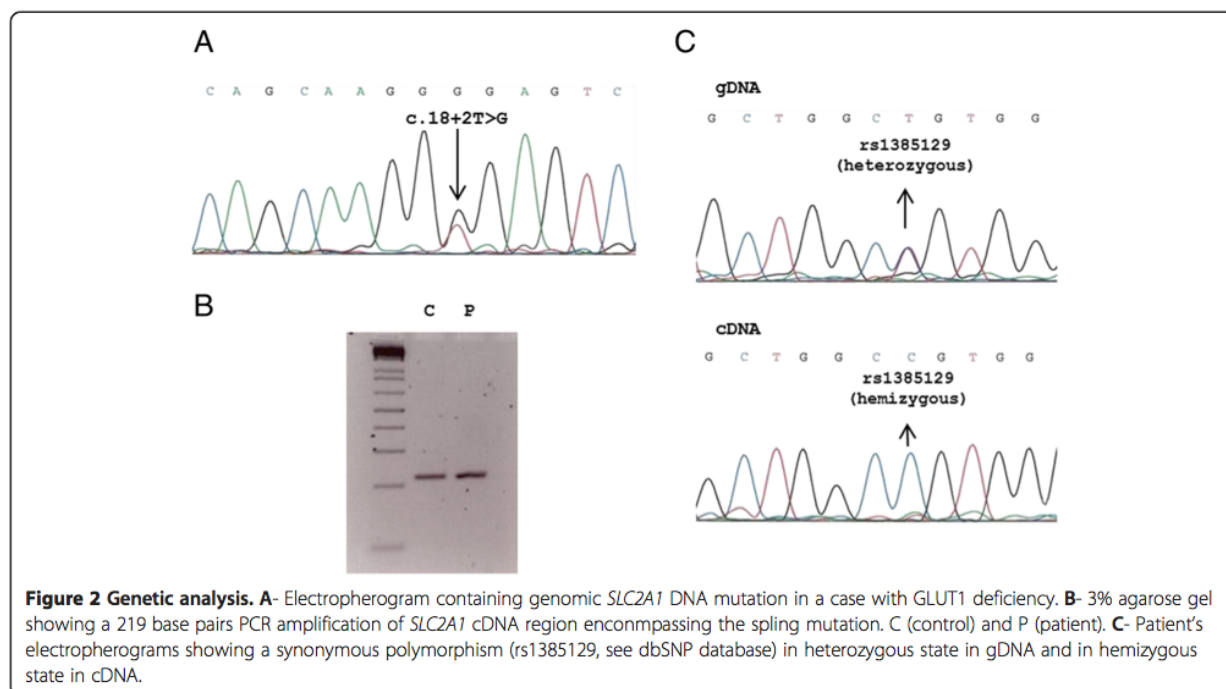
Sequencing of CoQ-related genes disclosed no known pathogenic variants. G1D was established after the detection of a new heterozygous variant (c.18+2T>G) in the first intron of the *SLC2A1* gene (Figure 2A). The variant was not present in 200 studied alleles of Spanish ancestry. Conservation of the nucleotide position was high according to Phylophen scores and splice prediction software indicated a truncation of the splice site donor

(data not shown). The cDNA region encompassing the genomic DNA mutation was amplified to detect a possible altered mRNA transcript in the patient. The PCR product did not show alternate amplification bands other than the control one (Figure 2B). Patient's sample direct sequencing showed only the wild type transcript, lacking any hint of an aberrant transcript consequence of the intronic mutation identified in gDNA. Concurrently, patient carried a heterozygous SNP (rs1385129) located in exon 2, initially identified in gDNA (both alleles (T/C) were represented). We analyzed this SNP on the cDNA sequence (Figure 2C), and only one allele was present (C), pointing out that half doses of wild type mRNA was not present. Since the variant is located in the splice donor site and we only detected one allele of rs1385129 in the patient's cDNA, downstream of c.18+2T>G, we hypothesize that splicing of the *SLC2A1* mRNA could be altered.

Therapeutic interventions

After initiation of a ketogenic diet at 14 years old, dysarthria was controlled. At this age and prior to KD, myoclonic jerks with absences were present and EEG disclosed slow basal rhythm (alpha: 7–8 Hz) and generalized spike-wave discharges at 2.5 HZ, suggesting atypical absences. At that moment, patient was treated with valproate and ethosuximide. Epilepsy was totally controlled after 3 months of KD, and EEG disclosed normal results, except for slow basal activity. Antiepileptic treatment was progressively removed after 7 months of KD. At 15 years EEG showed a





normal basal rhythm without paroxysms. Ataxia did not appear during KD therapy. Plasma CoQ levels were normal after initiation of a KD (0.58 $\mu\text{mol/L}$; reference values shown in Table 1).

Discussion

We present for the first time, the identification of CoQ deficiency in a patient with G1D. Our clinical and biochemical observations warrant further discussion because of their potential pathophysiological and therapeutic implications.

Concerning the pathophysiology of G1D, Marin-Valencia et al. [9], demonstrated in a G1D mouse model a diminished cerebral lipid synthesis. Importantly, this deficient lipid biosynthesis could contribute to secondary CoQ deficiency. The muscle CoQ deficiency detected in our patient was mild, and this would explain that MRC enzyme activities were low-normal. However, we interrogated mitochondrial function due to the conjunction of the clinical findings and the consistent hyperlactacidemia and hyperalaninemia observed in our case. The experiments conducted in fibroblasts confirmed the CoQ deficiency, in agreement with its potential role in the pathophysiology of G1D [11]. Especially relevant were the differences of growth observed between fibroblasts cultured with either glucose or galactose and the recovery of CoQ in galactose growth. Glucose transport was impaired in the mutant line, but not galactose influx, which is able in turn to promote CoQ biosynthesis

[15]. The human genome encodes for fourteen GLUT proteins that cooperate to transport different substrates other than glucose [16].

The normalization of growth of G1D cells after the incubation of fibroblasts with CoQ suggests the potential benefit of this coadjuvant therapy for G1D patients, which deserves further investigations. Although the mutation detected in *SLC2A1* is compatible with the common G1D phenotype, we cannot rule out the existence of mutations in other genes involved in CoQ metabolism given the fact that the CoQ metabolic pathway is not well understood.

The observed clinical improvement after CoQ supplementation in our patient supports these statements given that the most severe cerebellar manifestations proved amenable to CoQ therapy [13]. The simplest interpretation of our clinical observations is provided by the notion that the cerebellum is an extremely sensitive organ to oxidative stress and energy metabolic disorders, consistent with the near-universal demonstration of cerebellar manifestations even in cases of mild CoQ deficiency [11,13]. Once a ketogenic diet was initiated, the clinical outcome was excellent, with a complete cessation of epilepsy and other signs. We did not simultaneously treat the patient with CoQ and the ketogenic diet in order to separately elucidate the individual effects of both interventions. It is possible that a ketogenic diet causes a recovery in lipid biosynthesis that favorably impacts CoQ abundance.

Conclusions

CoQ deficiency might be a new factor in the pathogenesis of G1D, although CoQ deficiency needs to be confirmed in a larger group of G1D patients as well as in animal models. Although KD seems to correct the clinical consequences of CoQ deficiency, adjuvant treatment with CoQ could be trialled in this condition if our findings are confirmed in further G1D patients. Furthermore, since molecular basis of CoQ deficiency syndrome remains elusive in most cases, the investigation of GLUT1 deficiency is advisable in cases presenting ataxia and epilepsy.

Consent

Written informed consent was obtained from the patient's parents for publication of this case report and any accompanying images. A copy of written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Abbreviations

G1D: GLUT1 deficiency syndrome; CoQ: Coenzyme Q₁₀; MRC: Mitochondrial respiratory chain; gDNA: Genomic DNA; HDF: Human Dermal Fibroblasts; KD: Ketogenic diet.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MP, PN and RA participated in the design of the study. DY, JA, CE, PB, MR, MVC, AG, RM, CJM and AO provided all of the biochemical and molecular data. CJ did the hystopathological investigations. MOC, MP, EC and AA were in charge of the neurological explorations and therapeutic interventions. All authors helped in drafting the manuscript and read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This research was funded by grants PI11/02350, PI11/00078, PI1400028 and PI14-01962 from the Spanish Ministry of Health (Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III). R. Artuch is supported by "programa de intensificación de la actividad investigadora" and D. Yubero by "ayudas predoctorales de formación en investigación" (Ref: 12/00580) from FIS.

Author details

¹Clinical Biochemistry, Pediatric Neurology, Histopathology, Gastroenterology-Nutrition and Neuromuscular Unit Departments. Hospital Sant Joan de Déu and Centre For research in rare diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain. ²Instituto de Investigación Príncipe Felipe, CIBERER, Valencia, Spain. ³Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-CSIC-JA and CIBERER, Sevilla, Spain. ⁴Instituto de Bioquímica Clínica, Hospital Clinic i provincial, CIBERER, Barcelona, Spain.

Received: 4 July 2014 Accepted: 21 October 2014

References

- Pearson TS, Akman C, Hinton VJ, Engelstad K, De Vivo DC: **Phenotypic spectrum of glucose transporter type 1 deficiency syndrome (Glut1 DS).** *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013, **13**:342–347.
- Leen WG, Klepper J, Verbeek MM, Leferink M, Hofste T, van Engelen BG, Wevers RA, Arthur T, Bahi-Buisson N, Ballhausen D, Bekhof J, van Bogaert P, Carrilho I, Chabrol B, Champion MP, Coldwell J, Clayton P, Donner E, Evangelidou A, Ebinger F, Farrell K, Forsyth RJ, de Goede CG, Gross S, Grunewald S, Holthausen H, Jayawant S, Lachlan K, Laugel V, Leppig K, et al: **Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder.** *Brain* 2010, **133**:655–670.
- Pons R, Collins A, Rotstein M, Engelstad K, De Vivo DC: **The spectrum of movement disorders in Glut-1 deficiency.** *Mov Disord* 2010, **25**:275–281.
- Arsov T, Mullen SA, Rogers S, Phillips AM, Lawrence KM, Damiano JA, Goldberg-Stern H, Afawi Z, Kivity S, Trager C, Petrou S, Berkovic SF, Scheffer IE: **Glucose transporter 1 deficiency in the idiopathic generalized epilepsies.** *Ann Neurol* 2012, **72**:807–815.
- De Vivo DC, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI: **Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures and developmental delay.** *N Engl J Med* 1991, **325**:703–709.
- Seidner G, Álvarez MG, Yeh JL, O'Driscoll KR, Klepper J, Stump TS, Wang D, Spinner NB, Birnbaum MJ, De Vivo DC: **GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier.** *Nat Genet* 1998, **18**:188–191.
- Klepper J, Scheffer H, Leindecker B, Gertsens E, Binder S, Leferink M, Hertzberg C, Näke A, Voit T, Willemsen MA: **Seizure control and acceptance of the ketogenic diet in GLUT1 deficiency syndrome: a 2- to 5-year follow-up of 15 children enrolled prospectively.** *Neuropediatrics* 2005, **36**:302–308.
- Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Chung S, Sun RP, De Vivo DC: **Glut-1 deficiency syndrome: clinical, genetic, and therapeutic aspects.** *Ann Neurol* 2005, **57**:111–118.
- Marín-Valencia I, Good LB, Ma Q, Duarte J, Bottiglieri T, Sinton CM, Heilig CW, Pascual JM: **Glut1 deficiency (G1D): epilepsy and metabolic dysfunction in a mouse model of the most common human phenotype.** *Neurobiol Dis* 2012, **48**:92–101.
- Marín-Valencia I, Good LB, Ma Q, Malloy CR, Pascual JM: **Heptanoate as a neural fuel: energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter 1-deficient (G1D) brain.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2013, **33**:175–182.
- Laredj LN, Licitra F, Puccio HM: **The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease.** *Biochimie* 2013, **100**:78–87.
- Emmanuele V, López LC, Berardo A, Naini A, Tadesse S, Wen B, D'Agostino E, Solomon M, DiMauro S, Quinzii C, Hirano M: **Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review.** *Arch Neurol* 2012, **69**:978–983.
- Pineda M, Montero R, Aracil A, O'Callaghan MM, Mas A, Espinos C, Martínez-Rubio D, Palau F, Navas P, Briones P, Artuch R: **Coenzyme Q(10)-responsive ataxia: 2-year-treatment follow-up.** *Mov Disord* 2010, **25**:1262–1268.
- Montero R, Sánchez-Alcázar JA, Briones P, Hernández AR, Cordero MD, Trevisson E, Salviati L, Pineda M, García-Cazorla A, Navas P, Artuch R: **Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes.** *Clin Biochem* 2008, **41**:697–700.
- López-Martín JM, Salviati L, Trevisson E, Montini G, DiMauro S, Quinzii C, Hirano M, Rodríguez-Hernández A, Cordero MD, Sánchez-Alcázar JA, Santos-Ocaña C, Navas P: **Misense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis.** *Hum Mol Genet* 2007, **16**:1091–1097.
- Thorens B, Mueckler M: **Glucose transporters in the 21st Century.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010, **298**:E141–E145.

doi:10.1186/s12887-014-0284-5

Cite this article as: Yubero et al.: Association between coenzyme Q₁₀ and glucose transporter (GLUT1) deficiency. *BMC Pediatrics* 2014 **14**:284.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Publicació 4

Títol:

Coenzyme Q10 and pyridoxal phosphate deficiency is a common feature in mucopolysaccharidosis type III

Autors:

Dèlia Yubero, Raquel Montero, Mar O'Callaghan, Mercè Pineda, Silvia Meavilla, Veronica Delgadillo, Cristina Sierra, Laura Altimira, Plácido Navas, Simon Pope, Marcus Oppenheim, Viruna Neergheen, Arunabha Ghosh, Phillipa Mills, Peter Clayton, Emma Footitt, Maureen Cleary, Iain Hargreaves, Simon A Jones, Simon Heales, Rafael Artuch.

Referència:

JIMD Reports 2015 Jul 24; pp1-7 [Epub ahead of print].

Resum:

Basant-nos en la descripció prèvia del nostre grup de casos de MPS i deficiència de CoQ₁₀ plasmàtica (Delgadillo et al., 2011) en el context d'un assaig clínic amb genisteïna, l'objectiu d'aquest estudi fou l'avaluació més profunda de l'estat nutricional d'un grup de pacients amb MPS tipus III, una malaltia d'acumulació lisosomal, causada per mutacions en els gens que codifiquen enzims que degraden l'heparan sulfat. Vam analitzar diverses vitamines i micronutrients en sang i, en 2 casos, vam comptar amb la col·laboració del Great Ormond Street Hospital de Londres que havien fet l'anàlisi del piridoxal fosfat (PLP) en LCR. La nostra cohort de pacients presentava deficiència de PLP i de CoQ₁₀ en plasma pràcticament en tots els pacients reclutats, amb una mitjana aritmètica dels valors de PLP i CoQ₁₀ significativament més baixa que en pacients sans (prova estadística U de Mann-Whitney, p=0.006 i p=0.001, respectivament). Els valors de PLP també es trobaven reduïts en LCR. A més, vàrem demostrar que hi ha una associació significativa ($\chi^2=7.137$; p=0.008) entre ambdues deficiències, i potencialment existiria un mecanisme comú per explicar aquesta associació. Per tant, presentem una deficiència combinada de PLP i CoQ₁₀ en pacients amb MPS tipus III. Ambdós compostos podrien ser utilitzats com a teràpia coadjuvant en aquest tipus de

pacients, a l'aguait de noves teràpies gèniques que s'estan investigant en l'actualitat.

Coenzyme Q₁₀ and Pyridoxal Phosphate Deficiency Is a Common Feature in Mucopolysaccharidosis Type III

Dèlia Yubero · Raquel Montero · Mar O'Callaghan ·
Mercè Pineda · Silvia Meavilla · Veronica Delgado ·
Cristina Sierra · Laura Altimira · Plácido Navas ·
Simon Pope · Marcus Oppenheim · Viruna Neergheen ·
Arunabha Ghosh · Phillipa Mills · Peter Clayton ·
Emma Footitt · Maureen Cleary · Iain Hargreaves ·
Simon A. Jones · Simon Heales · Rafael Artuch

Received: 04 December 2014 / Revised: 16 January 2015 / Accepted: 13 February 2015
© SSIEM and Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of lysosomal storage disorders caused by deficiencies of lysosomal enzymes catalyzing degradation of glycosaminoglycans (GAGs). Previously, we reported a secondary plasma coenzyme Q₁₀ (CoQ) deficiency in MPS patients. For this study, nine MPS patients were recruited in the Hospital Sant Joan de Déu (HSJD, Barcelona) and two patients in the Neurometabolic Unit, National Hospital (NMU, London), to explore the nutritional status of MPS

type III patients by analyzing several vitamins and micro-nutrients in blood and in cerebrospinal fluid. Plasma CoQ and plasma and cerebrospinal fluid pyridoxal phosphate (PLP) content were analyzed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) with electrochemical and fluorescence detection, respectively. We found that most MPS-III patients disclosed low plasma pyridoxal phosphate (PLP) values (seven out of nine) and also low plasma CoQ concentrations (eight out of nine). We observed significantly lower median values of PLP, tocopherol, and CoQ (Mann–Whitney *U* test, $p = 0.006$, $p = 0.004$, and $p = 0.001$, respectively) in MPS patients when compared with age-matched controls. Chi-square test showed a significant association between the fact of having low plasma PLP and CoQ values in the whole cohort of patients. Cerebrospinal fluid PLP values were clearly deficient in the two patients studied. In conclusion, we report a combined CoQ and PLP deficiency in MPS-III patients. These observations could be related to the complexity of the physiopathology of the disease. If our results are confirmed in larger series of patients, CoQ and PLP therapy could be trialed as coadjutant therapy with the current MPS treatments.

Communicated by: Marc Patterson

Competing interests: None declared

D. Yubero · R. Montero · M. O'Callaghan · M. Pineda · S. Meavilla · V. Delgado · C. Sierra · L. Altimira · R. Artuch (✉)
Clinical Chemistry, Gastroenterology and Neurology Departments,
Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona 08950, Spain
e-mail: rartuch@hsjdbcn.org

S. Heales
Chemical Pathology, Great Ormond Street Hospital, London, UK

R. Montero · P. Navas · R. Artuch
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras
(CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

P. Navas
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de
Olavide-CSIC-JA, Sevilla, Spain

S. Pope · M. Oppenheim · V. Neergheen · I. Hargreaves · S. Heales
Neurometabolic Unit, National Hospital, Queen Square, London, UK

A. Ghosh · S.A. Jones
Willink Unit, Manchester Centre for Genomic Medicine, CMFT,
University of Manchester, Manchester, UK

P. Mills · P. Clayton · E. Footitt · M. Cleary · S. Heales
Genetics and Genomic Medicine, UCL Institute of Child Health,
London, UK

Introduction

Mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of lysosomal storage disorders caused by deficiencies of lysosomal enzymes catalyzing degradation of glycosaminoglycans (GAGs) (Neufeld and Muenzer 2001). Among them, MPS type III (MPS-III) or Sanfilippo syndrome is an autosomal recessive lysosomal storage disease caused by mutations in

one of four genes which encode enzyme activities required for the lysosomal degradation of heparan sulfate. Four types have been recognized: heparan *N*-sulfatase is deficient in type A (OMIM #252900), α -*N*-acetylglucosaminidase in type B (OMIM #252920), acetyl-CoA α -glucosamide acetyltransferase in type C (OMIM# 252930), and *N*-acetylglucosamine 6-sulfatase in type D (OMIM# 252940) (Neufeld and Muenzer 2001). This disorder primarily affects the central nervous system (Yogalingam and Hopwood 2001), being the only MPS with relatively minor somatic disease. It is characterized by speech delay, behavioral problems, progressive cognitive decline, dysmorphic facial features, loss of motor skills, and epilepsy. Due to the nonspecific clinical symptoms, a diagnostic delay is common in MPS-III (Neufeld and Muenzer 2001; de Ruijter et al. 2012). Over 300 mutations in the four genes (*SGSH*, *NAGLU*, *HGSNAT*, *GNS*) encoding for the enzymes have been described to date (Wijburg et al. 2013).

Coenzyme Q₁₀ (CoQ) is an endogenously synthesized lipid present in all types of cells and in plasma associated with cholesterol transport lipoproteins. CoQ acts as an electron transporter inside the mitochondrial respiratory chain (MRC) and is necessary for ATP production. Among other biological properties, the reduced form of CoQ is an effective antioxidant for both cell membranes and plasma lipoproteins and also recycles α -tocopherol (Navas et al. 2007; Sohal 2004). Several secondary CoQ deficiencies related to different neurodegenerative conditions have been reported. In 2011, Delgado et al. reported for the first time plasma CoQ deficiency in different MPS patients monitored during genistein treatment (Delgado et al. 2011).

Owing to these preliminary findings, our aim was to explore the nutritional status of different MPS-III patients by analyzing several vitamins and micronutrients in blood. Additionally, we were able to analyze the CSF of two further MPS-III patients.

Material and Methods

Subjects

Patient samples were received by Hospital Sant Joan de Déu (HSJD, Barcelona) and the Neurometabolic Unit (NMU), National Hospital, Queen Square, London. In HSJD, nine MPS type III patients were studied (range age: 5–17 years; average 11 years) for nutritional assessment. Five out of nine patients were MPS-IIIA, three were MPS-IIIB, and one patient was type IIIC. At the time of the study, no patient was receiving a vitamin or CoQ supplement. Four out of nine patients were on treatment with genistein (100–150 mg/kg/day) following a previously reported protocol (Delgado et al. 2011). In five of them,

seizures were being treated with a combination of different antiepileptics (lamotrigine, carbamazepine, and phenobarbital). Due to new onset movement disorders, cerebrospinal fluid (CSF) neurotransmitters and pyridoxal phosphate (PLP) concentration was assessed, by the NMU, from two patients with MPS-IIIA (4 and 16 years old).

Control population: All blood analyses results were compared with the age-dependent reference values established for each biochemical parameter in HSJD laboratory. Moreover, we selected an age-matched healthy pediatric population ($n = 9$; range age: 5–17 years; average = 11 years) to assess biochemical data in parallel with MPS patients. All controls were healthy subjects who came to the hospital for routine analysis: exclusion criteria were the diagnosis of inborn errors of metabolism or any other genetic or chronic condition, pharmacological treatments, or special diets. For assessment of pyridoxal phosphate status in CSF, results were compared to the NMU-established age-related reference intervals (Ormazabal et al. 2008).

Ethical issues: The study was approved by the Ethical Committee of the Hospital Sant Joan de Déu, and samples from patients and controls were obtained according to the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2001. CSF analysis was performed after informed consent and at the request of the clinical team.

Nutritional Study

Dietary questionnaires were completed by patient's parents and were performed to the 9 MPS-III patients selected. Nutritional status was followed up by the gastroenterology and nutrition department of the HSJD.

Laboratory Studies

Blood and urine samples were collected in the fasting state. Blood samples were centrifuged to $1,500 \times g$ for 10 min at 4°C and the plasma/serum samples obtained were stored at -80°C up to the day of the analysis. Urine samples were collected and stored at -20°C until the moment of the analysis. CSF PLP was collected, stored at -80°C , and processed as previously described (Ormazabal et al. 2008).

In blood samples, routine parameter analyses (blood count, ions, glucose, hepatic and renal function, lipid and iron metabolism markers) were performed by standardized automated analysis. Amino acids were measured by ion-exchange chromatography with spectrophotometric detection after ninhydrin derivatization in a Biochrom 30 analyzer (Chromsystems UK). For nutritional markers in blood (plasma/serum), we analyzed plasma CoQ content by reversed-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection (Montero et al.

2005), and vitamin E, vitamin A, vitamin B₁, and pyridoxal phosphate (PLP) were measured by HPLC with UV and fluorescence detection following previously reported procedures (Ormazabal et al. 2008; Moyano et al. 1997; Lu and Frank 2008). Serum folate and vitamins B₁₂ and D were quantified by automated chemoluminescence procedures in an ARCHITECT analyzer (Abbot, USA). For trace element analysis (zinc, copper, and selenium), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was applied, as reported (Tondo et al. 2010). Urinary total GAGs excretion in patients during the study was done by the automated-DMB spectrophotometric assay.

All patients were diagnosed with MPS-III A, B, or C on the basis of the demonstration of enzymatic activity deficiency of particular lysosomal hydrolases in leukocytes or skin fibroblasts (sulfamidase, α -N-acetylglucosaminidase, and heparin- α -glucosaminido-acetyltransferase). In all cases molecular studies were performed for identification of pathogenic mutations by automated DNA Sanger sequencing method (data available on request).

Statistical Studies

De Mann–Whitney *U* test was used to compare data for all the variables analyzed between MPS patients and age-matched controls. Chi-square test was applied to search for categorical association among the different biochemical parameters included in the study. Statistical differences were considered when *p* was <0.05. Statistical analysis was done with the SPSS 22.0 program.

Results

Nutritional Studies

Dietary assessments of the MPS patients confirmed that dietary intake was correct for their age according to recommended dietary allowances (data not shown). Moreover, all of them were able to feed normally and none required enteral feeding by gastric button or other feeding device.

Biochemical Results

Routine parameters (blood count, ions, glucose, hepatic and renal function makers, alkaline phosphatase, lipid and iron metabolism) and other nutritional biomarkers (amino acids; vitamins B₁, B₁₂, and A; folate and trace elements) were within the reference ranges in all MPS patients (data not shown). The urinary GAGs excretion was altered in all MPS patients at the time of the study (range 12.6–24.2 mg/mmol creat).

Main biochemical results are stated in Tables 1 and 2. The results of MPS patients and age-matched controls are expressed as range and average and as range for reference values established in our laboratory. Most MPS patients showed low plasma PLP values (seven out of nine) and also low plasma CoQ concentrations (eight out of nine) (Table 2). The other parameters stated in Table 1 were normal or slightly impaired in a minority of cases. Interestingly, CSF PLP values were below the appropriate reference range for both patients studied (Table 1).

When we compared the blood biochemical parameters in the two groups of subjects (MPS vs age-matched controls), we observed significantly lower median values of PLP, tocopherol, and CoQ (Mann–Whitney *U* test, *p* = 0.006, *p* = 0.004, and *p* = 0.001, respectively) in MPS patients (Table 1, Fig. 1). No differences were observed in total cholesterol values, alkaline phosphatase activity, total homocysteine, and the other parameters between the two groups. Chi-square test showed a significant association between the fact of having low plasma PLP and CoQ values in the whole cohort of patients and controls studied ($\chi^2 = 7.137$; *p* = 0.008), but not with other parameters analyzed. No association was found between both CoQ and PLP deficiency and the antiepileptic treatment.

Discussion

In a previous report, we studied 30 patients (2–23 years; 9.8 average) with diagnosis of different MPS (19 of them MPS-III) during the monitoring of genistein treatment (Delgadillo et al. 2011). In that report, decreased plasma CoQ values were a common feature. Thus, we have done a nutritional study in nine selected MPS-III patients, and CoQ deficiency was detected in most of them. Furthermore, not only plasma CoQ was decreased, but also a PLP deficiency was present in seven out of nine cases studied. Other nutritional parameters were assessed as normal or showed only minor differences when compared to reference values.

Concerning CoQ deficiency, we do not have yet an explanation for this finding. Total cholesterol values were normal, suggesting that the cause of such deficiency is probably unrelated to impaired cholesterol biosynthesis (and consequently CoQ biosynthesis). This statement would be supported by the data of Matalonga et al., who demonstrated a normal CoQ biosynthesis rate in cultured skin fibroblast from MPS patients (Matalonga et al. 2014). Plasma CoQ values depend on dietary sources (around 20% of total CoQ) and liver biosynthesis, but dietary CoQ deficiency is unlikely considering the adequate nutritional status of our patients and the normality of most of the other vitamins and trace elements analyzed. However, an absorption problem in the gut for CoQ cannot be ruled out at this

Table 1 Main plasma biochemical data of MPS patients and control subjects are stated. The results of MPS patients and age-matched controls are expressed as range and average and as range for reference values established in our laboratory. The number of patients displaying impaired results is also indicated

	MPS patients (<i>n</i> = 9) (5–17) 11 years	Age-matched controls (<i>n</i> = 9) (5–17) 11 years	Reference values
Alkaline phosphatase (UI/L)	(72–315) 207 0/9	(37–277) 167 0/9	<365
Total homocysteine (μmol/L)	(5.9–24.8) 9.6 3/9	(3.1–10.0) 5.5 0/9	<9.2 (12–20 years) <7.5 (5–11 years)
Total cholesterol (mmol/L)	(3.1–5.6) 4.3 1/9	(3.3–5.9) 4.4 2/9	2.4–5.2
Retinol (μmol/L)	(1.0–2.1) 1.3 0/9	(0.8–1.4) 1.1 1/9	0.9–2.1
Tocopherol (μmol/L)	(12–26) 17.3 1/9	(18–34) 25.4 0/9	13–36
Pyridoxal phosphate (nmol/L)	(8–99) 27 7/9	(32–105) 69 0/9	30–169
Coenzyme Q ₁₀ (μmol/L)	(0.20–0.53) 0.32 8/9	(0.41–0.76) 0.53 0/9	0.41–1.15
Coenzyme Q ₁₀ /cholesterol ratio (mmol/mol)	(47–102) 74 9/9	(100–141) 120 2/9	115–316
CSF PLP values (nmol/L)	9 (4 years) 7 (16 years)	Not available	16–44 10–37

CSF cerebrospinal fluid

Table 2 Individual plasma biochemical data of the nine MPS patients, age-matched controls, and reference values are stated. Results of age-matched controls are expressed as range and average and as range for reference values

Patient MPS type	Age (years)	Coenzyme Q ₁₀ (μmol/L)	Pyridoxal phosphate (nmol/L)	Tocopherol (μmol/L)	Total cholesterol (mmol/L)	Glycosaminoglycans (mg/mmol creatinine)
1. IIIA	10	0.31	19	17	5.0	13.3
2. IIIA	8	0.35	20	19	4.2	14.1
3. IIIA	10	0.31	22	14	4.3	24.2
4. IIIA	5	0.21	35	12	3.1	22.5
5. IIIA	16	0.20	15	26	4.3	15.9
6. IIIB	14	0.31	8	17	3.4	17.5
7. IIIB	11	0.53	22	15	5.2	16.5
8. IIIB	9	0.36	99	21	5.7	14.2
9. IIIC	17	0.29	8	15	3.5	12.6
Age-matched controls	(5–17) 11	(0.41–0.76) 0.53	(32–105) 69	(18–34) 25	(3.3–5.9) 4.4	
Reference values		0.41–1.15	30–169	13–36	2.5–5.2	<6.4 (5–12 years) <4.5 (13–17 years)

stage. Diarrhea is common in children with MPS-III and may be severe, and the mouse model has increased submucosal thickness with lysosomal storage of GAG in this region and in the lamina propria of the villus tip (Roberts et al. 2009). Increased CoQ consumption may also be a factor explaining this deficiency, since some authors suggested the possible involvement of the reactive oxygen species in the MPS type IIIB disease pathogenesis (Villani et al. 2009). Recently a positive effect has been observed in cultured fibroblasts from

Sanfilippo A and B treated with CoQ and other antioxidants (Matalonga et al. 2014). Moreover, since CoQ participates in tocopherol recycling (Navas et al. 2007), the significantly lower median tocopherol values observed in our MPS patients when compared with age-matched controls might be related with the CoQ deficiency. The importance of these lower median tocopherol values is probably limited since in absolute values, most of the tocopherol results were normal when compared with the reference range.

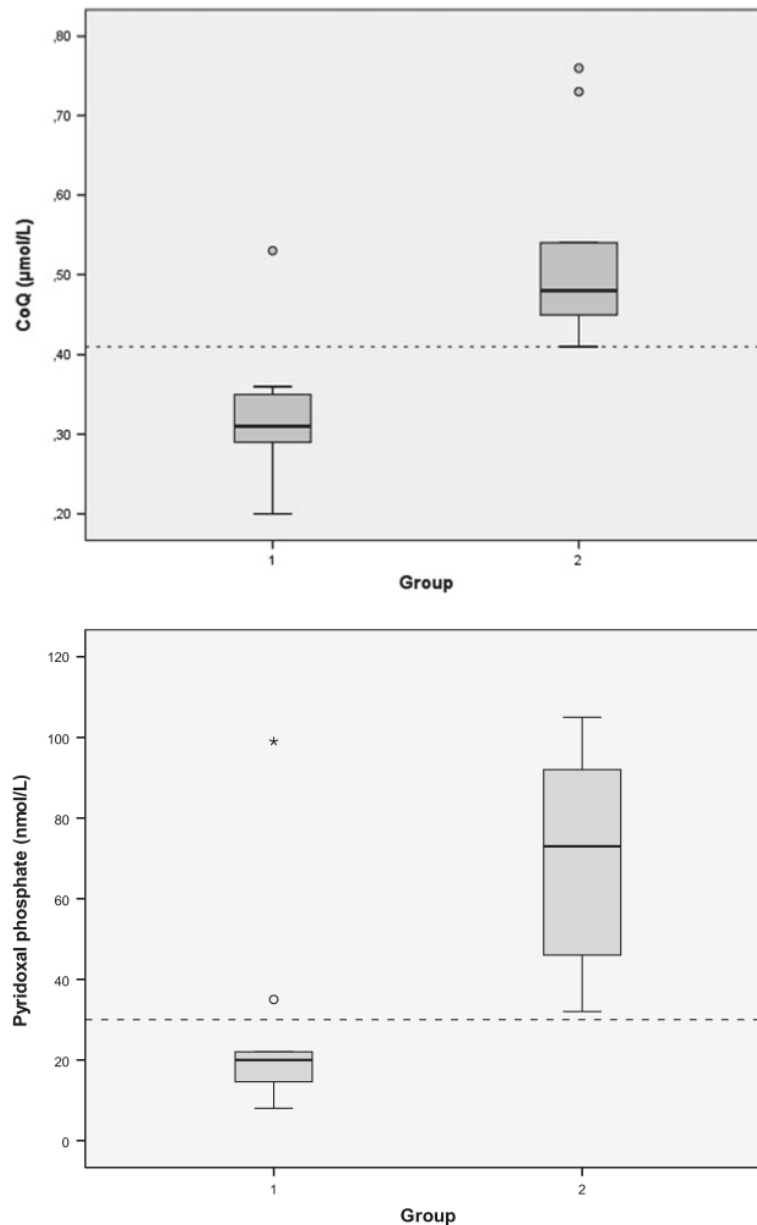


Fig. 1 The *box plot* represents PLP and CoQ values in group 1 (MPS patients) versus group 2 (age-matched controls). The *spot line* represents the minimum PLP and CoQ values in the reference population

As regards PLP deficiency, the explanation also remains elusive. The alkaline phosphatase activity (ALP) maintains the equilibrium needed to dephosphorylate PLP to pass through cell membranes. Increased ALP activity in plasma may lead to a secondary PLP deficiency. However, in our MPS patients, biochemical data supported a real PLP deficiency, since no increment of plasma ALP activity was demonstrated. The finding of PLP deficiency in both plasma and CSF might support a hypothesis of a transport defect affecting PLP movement across both the gut and the blood–brain barrier. Heparan sulfate and phosphory-

lated B₆ vitamers both bind to divalent cations, so it is conceivable that phosphorylated B₆ vitamers could become bound to HS.

An association between CoQ and PLP status has been reported (Spinneker et al. 2007). PLP is a versatile coenzyme and it is the essential cofactor for multiple reactions. It is involved in the transsulfuration pathway of homocysteine (and, although nonsignificant, some of our MPS patients showed some evidence of increased total homocysteine values at the time of the study), as well as in the metabolism of amino acids, neurotransmitters, and other

substrates (Spinneker et al. 2007). Furthermore, PLP is required for the formation of 4-hydroxyphenylpyruvic acid from tyrosine, the essential precursor of the benzoquinone ring of CoQ. In fact, it has been demonstrated that PLP deficiency is associated with low CoQ concentrations (Willis et al. 1999), which could explain CoQ deficiency as a secondary condition of low precursor availability.

The pathophysiology of the MPS disorders is complex, and the molecular basis and the sequence of events leading to neurodegeneration in MPS remain to be clarified. Several treatments have been designed for different types of MPS including enzyme replacement therapy, gene therapy, or substrate reduction therapy (Kakkis et al. 2001; Wraith et al. 2004; Piotrowska et al. 2006). These treatments lead the partial restoration of the enzyme activity or inhibition of GAG synthesis. However, such approaches have not been completely successful. PLP is the active form of vitamin B₆ and the cofactor of many enzyme reactions including neurotransmitter metabolism (dopamine, serotonin, and GABA among others). Primary and secondary PLP metabolism disturbances can produce refractory seizures in the newborn period and infancy that respond to this vitamin supplementation. Thus, PLP treatment seems advisable in this condition. On the other hand, the antioxidant properties of CoQ are well recognized. A chronic CoQ deficiency may lead to an increased oxidative stress that might in turn participate in neurodegeneration in MPS. Moreover, the demonstration of a beneficial effect of CoQ in GAGs accumulation in fibroblast further support that this therapy in combination with PLP would be advisable as adjuvant treatment in MPS patients presenting PLP and CoQ deficiency.

Conclusions

We report for the first time a combined CoQ and PLP deficiency in MPS-III patients. These observations could contribute to the complexity of the pathophysiology of the disease. After a careful evaluation of nutritional status in large series of MPS patients, both CoQ and PLP could be trialed as adjuvant therapy with the current MPS treatments.

Acknowledgments This research was partially funded by grants PI11/02350, PI11/00078, PI1400028, and PI14-01962 from the Spanish Ministry of Health (Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III). We are very grateful for the support of the “MPS España” association.

Synopsis

Combined CoQ and PLP deficiency is common in MPS-III patients.

 Springer

Compliance with Ethics Guidelines

Conflict of Interest

Dèlia Yubero, Raquel Montero, Mar O’Callaghan, Mercè Pineda, Silvia Meavilla, Veronica Delgadillo, Cristina Sierra, Laura Altimira, Plácido Navas, Simon Pope, Marcus Oppenheim, Viruna Neergheen, Arunabha Ghosh, Phillipa Mills, Peter Clayton, Emma Footitt, Maureen Cleary, Iain Hargreaves, Simon A. Jones, Simon Heales, and Rafael Artuch declare that they have no conflict of interest.

Informed Consent

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Informed consent was obtained from all patients for being included in the study. Informed consent was obtained and must be available upon request.

Author Contributions

All co-authors have peer-reviewed the manuscript and there is a consensus agreement to submission. Thus, we confirm the absence of previous similar and simultaneous publications. Dr. Yubero, Montero, O’Callaghan, Heales, and Artuch had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study concept and design: Yubero, Montero, O’Callaghan, Pineda, Hargreaves, Heales, and Artuch

Acquisition of data: Yubero, Montero, O’Callaghan, Pineda, Meavilla, Delgadillo, Sierra, Altimira, Pope, Oppenheim, Neergheen, Ghosh, Mills, Clayton, Footitt, Cleary, Jones, and Heales

Analysis and interpretation of data: Yubero, Montero, O’Callaghan, Navas, Mills, Clayton, Hargreaves, Heales, and Artuch

Drafting of the manuscript: All authors

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: All authors

Study supervision: Artuch

References

de Ruijter J, de Ru MH, Wagemans T et al (2012) Heparan sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides are sensitive markers for

- newborn screening for mucopolysaccharidoses types I, II and III. *Mol Genet Metab* 107:705–710
- Delgado V, O'Callaghan MM, Artuch R, Montero R, Pineda M (2011) Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J Inher Metab Dis* 34:1039–1044
- Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE et al (2001) Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidoses I. *N Engl J Med* 334:182–188
- Lu J, Frank EL (2008) Rapid HPLC measurement of thiamine and its phosphate esters in whole blood. *Clin Chem* 54:901–906
- Matalonga L, Arias A, Coll MJ, Garcia-Villoria J, Gort L, Ribes A (2014) Treatment effect of coenzyme Q(10) and an antioxidant cocktail in fibroblasts of patients with Sanfilippo disease. *J Inher Metab Dis* 37:439–446
- Montero R, Artuch R, Briones P et al (2005) Muscle coenzyme Q10 concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders. *Biofactors* 25:109–115
- Moyano D, Vilaseca MA, Pineda M et al (1997) Tocopherol in inborn errors of intermediary metabolism. *Clin Chim Acta* 263:147–155
- Navas P, Villalba JM, de Cabo R (2007) The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion* 7S:34–40
- Neufeld EF, Muenzer J (2001) The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS et al (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 3421–3452
- Ormazabal A, Oppenheim M, Serrano M et al (2008) Pyridoxal 5'-phosphate values in cerebrospinal fluid: reference values and diagnosis of PNPO deficiency in paediatric patients. *Mol Genet Metab* 94:173–177
- Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Baranska S et al (2006) Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet* 14:846–852
- Roberts AL, Howarth GS, Liaw WC et al (2009) Gastrointestinal pathology in a mouse model of mucopolysaccharidosis type IIIA. *J Cell Physiol* 219:259–264
- Sohal RS (2004) Coenzyme Q and vitamin E interactions. *Methods Enzymol* 378:146–151
- Spinneker A, Sola R, Lemmen V, Castillo MJ, Pietrzik K, González-Gross M (2007) Vitamin B6 status, deficiency and its consequences—an overview. *Nutr Hosp* 22:7–24
- Tondo M, Lambruschini N, Gomez-Lopez L et al (2010) The monitoring of trace elements in blood samples from patients with inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 33(Suppl 3):S43–S49
- Villani GR, Di Domenico C, Musella A, Cecere F, Di Napoli D, Di Natale P (2009) Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res* 1279:99–108
- Wijburg FA, Węgrzyn G, Burton BK, Tyłki-Szymańska A (2013) Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome) and misdiagnosis of idiopathic developmental delay, attention deficit/hyperactivity disorder or autism spectrum disorder. *Acta Paediatr* 102:462–470
- Willis R, Anthony M, Sun L, Honse Y, Qiao G (1999) Clinical implications of the correlation between coenzyme Q10 and vitamin B6 status. *Biofactors* 9:359–363
- Wraith JE, Clarke LA, Beck M et al (2004) Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (Iaronidase). *J Pediatr* 144:581–588
- Yogalingam G, Hopwood JJ (2001) Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type IIIA and IIIB: diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum Mutat* 18:264–281

CAPÍTOL 3

CAPÍTOL 3: Implementar avenços metodològics pel diagnòstic o seguiment de pacients amb deficiències de CoQ₁₀ i malalties mitocondrials

La base principal de la nostra recerca científica es fonamenta en la millora de la efectivitat diagnòstica en les malalties mitocondrials en general, i en els defectes de CoQ₁₀ en particular. Per això, un dels objectius més importants de la nostra investigació aplicada gira en torn a valorar l'eficàcia de les eines disponibles i al desenvolupament de noves aproximacions diagnòstiques (tant des del punt de vista de laboratori com de l'anàlisi estadístic de les dades obtingudes mitjançant proves de diagnòstic clàssiques) per establir un diagnòstic més precoç. Assolir un diagnòstic primerenc és imprescindible per millorar el pronòstic si hi ha teràpies disponibles. Alhora, és bàsica la contribució amb la identificació de noves malalties associades a defectes de CoQ₁₀ i l'aportació de noves eines no invasives per la monitorització del tractament amb CoQ₁₀. Els resultats per aquest objectiu són dos articles científics, un publicat i l'altre presentat en forma de manuscrit, enviat per a publicació.

Publicació 5

Títol:

Determination of urinary coenzyme Q10 by HPLC with electrochemical detection: Reference values for a paediatric population

Autors:

Dèlia Yubero, Raquel Montero, Maria Ramos, Viruna Neergheen, Plácido Navas, Rafael Artuch, Iain Hargreaves.

Referència:

Biofactors 2015 Nov 12;41(6):424-30.

Resum:

Vist que el síndrome nefròtic és un signe cada vegada més comú en les malalties mitocondrials i en especial en el síndrome de deficiència de CoQ₁₀, el nostre objectiu va ser la estandardització d'un nou procediment analític per la determinació CoQ₁₀ en les cèl·lules de descamació del sediment urinari, com a estimació de l'estat del CoQ₁₀ al ronyó. El CoQ₁₀ obtingut de cèl·lules aïllades de mostres d'orina es va analitzar per HPLC amb detecció electroquímica. Es van establir valors de referència (n=43), estratificats en dos rangs d'edat (2-10 anys: 24-109 nmol CoQ₁₀ /g proteïna del sediment; 11-17 anys: 43-139 nmol CoQ₁₀ /g proteïna del sediment). Vàrem establir les condicions idònies per l'anàlisi de CoQ₁₀ en cèl·lules de descamació del tracte urinari, i vàrem identificar diferents factors de variació que haurien de ser estandarditzats per una adequada interpretació de les dades. En resum, el procediment presentat és un mètode no invasiu, fiable i reproduïble que permetrà valorar l'estat de CoQ₁₀ en pacients amb malalties renals i mitocondrials.

Research Communication

Determination of urinary coenzyme Q₁₀ by HPLC with electrochemical detection: Reference values for a paediatric population

Dèlia Yubero¹
Raquel Montero¹
Maria Ramos²
Viruna Neergheen³
Plácido Navas⁴
Rafael Artuch^{1*}
Iain Hargreaves³

¹Clinical Biochemistry Department, Institut d'Investigació Sanitària Sant Joan De Déu and CIBERER, Barcelona, Spain

²Nephrology Department, Hospital Sant Joan De Déu, Barcelona, Spain

³Neurometabolic Unit, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, UK

⁴Cellular Biology and Biotechnology Department, Centro Andaluz De Biología Del Desarrollo, Universidad Pablo De Olavide and CIBERER, Sevilla, Spain

Abstract

Kidney dysfunction is being increasingly associated with mitochondrial diseases and coenzyme Q₁₀ (CoQ) deficiency. The assessment of CoQ status requires the biochemical determination of CoQ in biological fluids and different cell types, but no methods have been developed as yet for the analysis of CoQ in excretory systems. The aim of this study was to standardize a new procedure for urinary CoQ determination and to establish reference values for a paediatric population. Urinary CoQ

was analyzed by HPLC with electrochemical detection. Reference values ($n = 43$) were stratified into two age groups (2–10 years: range 24–109 nmol CoQ/gram of pellet protein; 11–17 years: range 43–139 nmol CoQ/gram of pellet protein). In conclusion, urinary CoQ analysis is a noninvasive, reliable, and reproducible method to determine urinary tract CoQ status.

© 2015 BioFactors, 41(6):424–430, 2015

Keywords: coenzyme Q10; mitochondrial disease; renal disease; urine; high pressure liquid chromatography; reference values

1. Introduction

Coenzyme Q₁₀ (CoQ) is a lipid that is present in all eukaryotic cells, being located in the mitochondria as well as in other subcellular fractions in addition to plasma lipoproteins. CoQ acts as an electron carrier in the mitochondrial respiratory chain being essential for ATP synthesis and also for the stabilization of the mitochondrial enzymatic complexes, for binding the permeability transition pore and the mitochondrial uncoupling proteins, and for the biosynthesis of pyrimidines [1,2].

CoQ also serves as an essential lipid soluble antioxidant protecting cellular membranes and lipoproteins against free radical induced oxidation [1,2].

The assessment of CoQ status requires its biochemical determination in biological fluids and different cell types. It is not known whether plasma CoQ reaches the tissues, since most of the cells have the capacity to *de novo* synthesize their own CoQ. Thus, plasma CoQ status may not truly reflect tissue levels [3], and the determination of cellular CoQ status is used in the identification of most of the CoQ deficient syndromes. A

© 2015 International Union of Biochemistry and Molecular Biology

Volume 41, Number 6, November/December 2015, Pages 424–430

*Address for correspondence: Dr. Rafael Artuch, Clinical Biochemistry Department, Hospital Sant Joan de Déu and CIBERER, Passeig Sant Joan de Déu, 2. 08950, Esplugues, Barcelona, Spain. E-mail: rartuch@hsjdbcn.org

Received 4 August 2015; accepted 8 October 2015

DOI 10.1002/biof.1242

Published online 19 November 2015 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com)

CoQ deficiency has been associated with a large-growing number of diseases, either as a primary genetic condition causing atypical mitochondrial disorders or as a secondary event associated with more prevalent diseases [4]. CoQ has been determined in blood mononuclear cells [3], platelets [5,6], cultured skin fibroblasts, and skeletal muscle cells [7–9]. However, as CoQ deficiencies are tissue specific, the CoQ status of cells used for these determinations may not represent a normal or a deficient state in other tissues [10].

Mitochondrial diseases in general and primary CoQ deficiencies in particular present a variable phenotypic spectrum. Interestingly, an increasing number of cases show up with renal involvement [11–16], as an isolated steroid-resistant nephrotic syndrome or associated to other phenotypic features. Nevertheless, urinary CoQ analysis has not been documented to our knowledge. Because kidney dysfunction associated with CoQ deficiency is being recognized, kidney epithelial cells may therefore be an appropriate surrogate to assess renal CoQ status. However, under normal conditions urine contains mainly epithelial cells from the bladder or from the external urethra. Tubular and glomerular cells arising from the kidney may appear in the urine associated to pathological conditions, such as nephrotic syndrome [17]. Thus, as a first step to the further study of several renal diseases including glomerular diseases, the aim of this study was to standardize a new procedure for urinary tract CoQ determination and to establish reference values for a paediatric population.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

For the establishment of reference values, urine samples (age range: 2–20 years; average: 7.76; standard deviation: 4.63) were collected from 43 control subjects who came to the Out-patient Unit at our hospital to exclude urinary infection. These controls neither present with a chronic condition nor were they taking pharmacological treatment at the commencement of the study. Samples exhibiting signs of infection (leukocytes, positive microbiological studies) were excluded from the study. The study was approved by the Ethical Committee of Hospital Sant Joan de Déu and conducted following the Helsinki Declaration, as revised in 2008.

2.2. Samples

First morning urine samples were collected in standard urine containers and samples were centrifuged (1,500*g*, 10 min) and optical microscopy assessment was undertaken in the sediment to determine white and red blood cell count. The urinary pellet was then washed with 9 mg mL⁻¹ saline to remove urinary proteins. Next, the saline was decanted and the urinary pellet was resuspended in 100 µL of saline per 10 mL of total urine. The resuspended pellet was stored frozen at –20°C until the moment of analysis. A minimum volume of 30 mL of urine was required and thus there was at least a final volume of 300 µL of the resuspended pellet per urine sample.

2.3. Preanalytical Conditions

Different preanalytical conditions were studied. First, to assess the effect of the urinary protein concentration on the CoQ values, the same urine was centrifuged and stored, washed once, twice, and three times with saline and then stored. For the determination of the minimum amount of pellet required for a reliable analysis of CoQ, three groups having different protein concentrations were established, and a minimum urinary volume was estimated. To assess the daily variability in the CoQ values, first-morning, half morning and afternoon urine samples from seven healthy volunteers were collected (a total of 21 samples). Then, to determine the effect of contaminating factors on urine CoQ values (the presence of red and white cells), different amounts of total blood (0.5, 1, 1.5 mL) were added to a volunteer urine sample. Leukocyte and bacterial contaminated urine samples were collected to assess the effect on CoQ values.

CoQ stability in the urine samples was studied by analyzing a pooled urine after 9 months of storage at –20°C, and also by the analysis of one urine sample collected under different conditions (1: Centrifuged and immediately stored at –20°C; 2: Collected and remaining at room temperature for 60 and 120 min before being stored at –20°C).

2.4. Analytical Conditions

A 100-µL pellet aliquot was used for the CoQ determination. After adding 20 µL of internal standard (CoQ₉, final concentration of 1.01 µmol L⁻¹) to the pellet aliquot and 100 µL of saline, deproteinization was undertaken by adding 500 µL of ethanol. Sample analytes were then extracted with 2 mL of *n*-hexane for 1 min. The organic layer was retained after centrifugation, evaporated under nitrogen stream, and resuspended in 200 µL of 65:35 methanol/ethanol (v/v). Total protein content of the resuspended urinary pellets (25 and 50 µL of sample) were determined by the Lowry method [18].

2.5. Reagents

CoQ₁₀ (external standard; Sigma, C-9538) and CoQ₉ (internal standard; Biochemika-Fluka, 27597) calibrators were diluted in HPLC-grade ethanol to obtain a final concentration of 1.47 and 1.01 µmol L⁻¹, respectively. A pellet pool from 15 random urine samples was used as internal quality control.

2.6. Chromatographic Conditions

CoQ was quantified by reverse-phase HPLC with electrochemical detection (Coulochem II, ESA, Chelmsford, MA), as previously reported [9], with slight modifications. The mobile phase consisted of 1.06 g L⁻¹ lithium perchlorate in methanol/ethanol (65:35, v/v). CoQ was separated in a Nucleosil 100 C-18 column (250 mm × 4 mm; 5 µm particle size, Teknokroma, TR-015519). Electrochemical detector cells were set to –600 mV and +600 mV (analytical cell, Model 5010). Flow rate was 1 mL min⁻¹ and injection volume of 70 µL for urine samples. Calibrators, controls and samples were prepared in the same way.

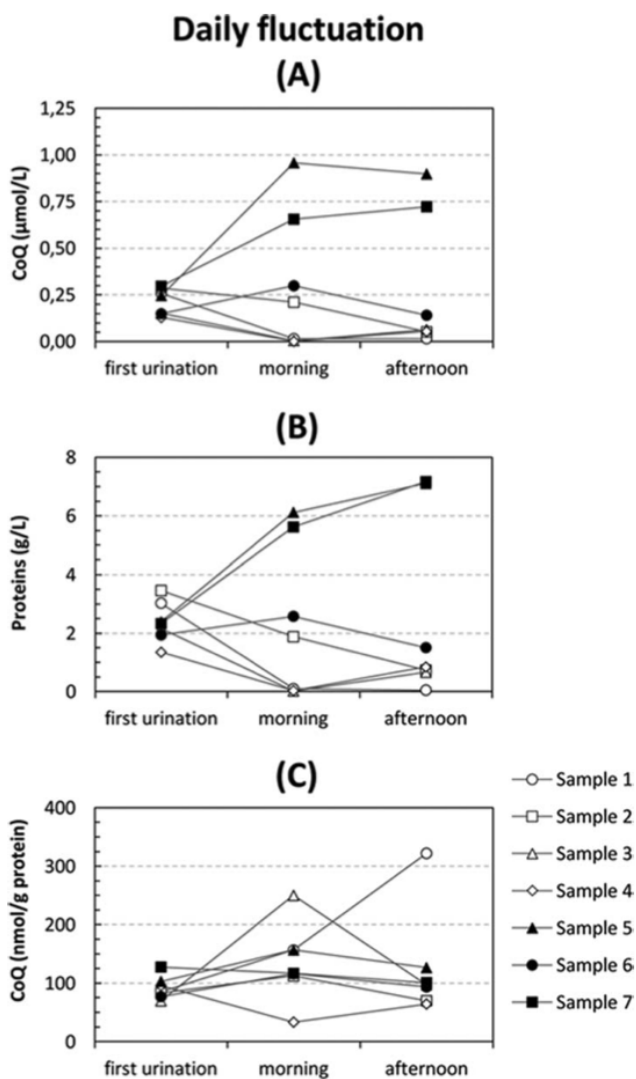


FIG 1

Daily fluctuation of CoQ values. (A) CoQ analyzed from the urine pellet, expressed in absolute values ($\mu\text{mol L}^{-1}$). First morning urine samples displayed the least fluctuating CoQ values. (B) Total pellet protein values were very variable. Only first urination samples present with pellet concentrations above 1 g L^{-1} . (C) CoQ values related with total pellet protein were less variable in first morning urine samples, and therefore these were selected.

Calibration curve (ranging from 0 to $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ CoQ), linearity (by dilution of a biological sample to assess reproducible concentrations), the intra-serial (by preparing 10 times three urine samples at different concentrations, and analysing them on the same day) and inter-serial coefficient of variation (CV) (preparing the same sample on 10 different days), recovery (by adding different amounts of known CoQ concentrations to reach four different final concentrations; samples were prepared in

triplicate) and limit of quantification (LOQ: signal-to-noise ratio = 10) were then calculated. Results of urinary CoQ values were expressed as nmol of CoQ related to the resuspended pellet protein concentration (nmol CoQ/g pellet protein).

2.7. Statistical Analysis

For the preanalytical conditions study, one factor ANOVA with Bonferroni correction was applied to check the minimum amount of pellet required. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to check data distribution. Because data followed a

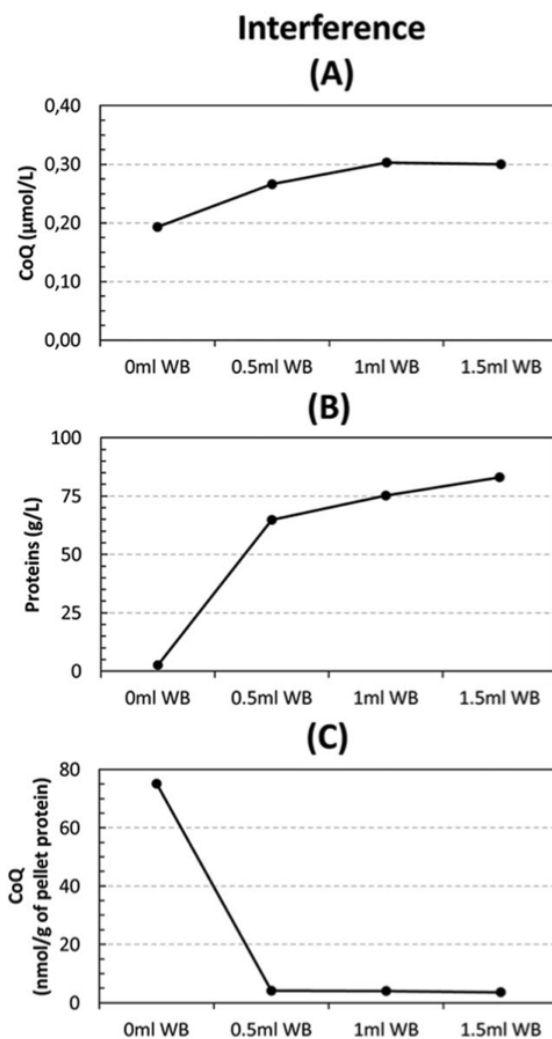


FIG 2

Urine samples contaminated with total blood (WB). (A) CoQ concentrations (expressed in $\mu\text{mol/L}$) showed a gradual increase. (B) Total pellet protein concentration also increased but more remarkably than CoQ absolute values. (C) CoQ values expressed as $\mu\text{mol g}^{-1}$ of pellet protein resulted then in a significant decrease. Final urine haemoglobin concentration was 0.38 g dL^{-1} (0.5 mL WB), 0.74 g dL^{-1} (1 mL WB), and 1.08 g dL^{-1} (1.5 mL WB).

TABLE 1

Metrological features and reference values for urinary Coenzyme Q10 in paediatric population

Metrological features

CV intra-assay	3.03% for a concentration of 0.44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 1.26% for a concentration of 0.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 6.21% for a concentration of 0.092 $\mu\text{mol L}^{-1}$
CV inter-assay	8.12% for a concentration of 0.114 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Recovery	118% (21 nmol L^{-1}) 96.7% (41 nmol L^{-1}) 98.3% (99 nmol L^{-1}) 110% (144 nmol L^{-1})
LOQ	19 nmol L^{-1}
Linearity	0.025–1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Calibration curve (0–2 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	$Y = 3.6\text{E-}3 + 1.15\text{E-}3 * X$; $r^2 = 0.999$

Reference values

Age	Coenzyme Q ₁₀ (nmol CoQ/g of pellet protein)				
	<i>n</i> = 43	Mean	SD	Minimum	Maximum
2–10 years ^a	30	61	24.5	24	109
11–17 years ^a	13	84	32.9	43	139

CV (coefficient of variation); LOQ (Limit of quantification); SD (standard deviation).

^aStudent's *t* test showed significant differences between age interval groups ($P = 0.016$).

Gaussian distribution, Pearson's test was applied to study single correlations between CoQ, total protein concentration and the age of pediatric controls. Student's *t* test values were used to compare CoQ values among the established age groups. A *P* value <0.05 was considered to be statistically significant. Statistical calculations were performed using SPSS 22.0. version.

3. Results

3.1. Preanalytical Studies

3.1.1. Sample preparation

To assess cellular loss during sample collection and interferences of urinary protein concentration, urine pellets were gathered in different phases of the washing procedure. As no variations of CoQ content were detected, the procedure was optimized to one washing step.

3.1.2. Minimum amount of pellet required by the analysis of CoQ

In patients with a protein pellet concentration ranging from 1 to 5 g L^{-1} , correlation between pellet protein and CoQ values was statistically significant ($r = 0.759$, $P < 0.0001$), but not in the range of 0.1–0.97 g L^{-1} of total pellet protein. Three groups were established according to the pellet protein con-

centration: (1) with <1 g L^{-1} ($n = 43$, median = 280 nmol CoQ/gram of pellet protein, SD = 41.7, range = 0.1–1,003), (2) with 1–2 g L^{-1} ($n = 23$, median = 62, SD = 31.4, range = 24–139), and (3) with >2 g L^{-1} ($n = 20$, median = 74, SD = 25.1, range = 25–136). Statistical analysis using ANOVA with Bonferroni showed significant differences between group 1 and groups 2 and 3 ($P < 0.0001$ for both comparisons, confidence interval 94.1–241.3 and 76.4–335.4, respectively), but not between groups 2 and 3. The minimum amount of pellet protein concentration required for a reliable urine CoQ quantification was established at >1 g L^{-1} . Furthermore, the first urine sample which displayed as an outlier with very high CoQ results had a pellet protein concentration of 0.97 g L^{-1} protein, resulting in a CoQ value of 298 nmol g^{-1} of pellet protein.

3.1.3. Daily fluctuation

First morning urine samples showed the least variable data concerning CoQ and pellet proteins amongst the different individuals (Fig. 1). Furthermore, there were remarkable and uncontrollable changes in pellet protein concentration in half-morning and afternoon urine samples in some individuals that led to a high variability of CoQ values expressed as $\mu\text{mol L}^{-1}$ and also when related to pellet protein (Fig. 1).

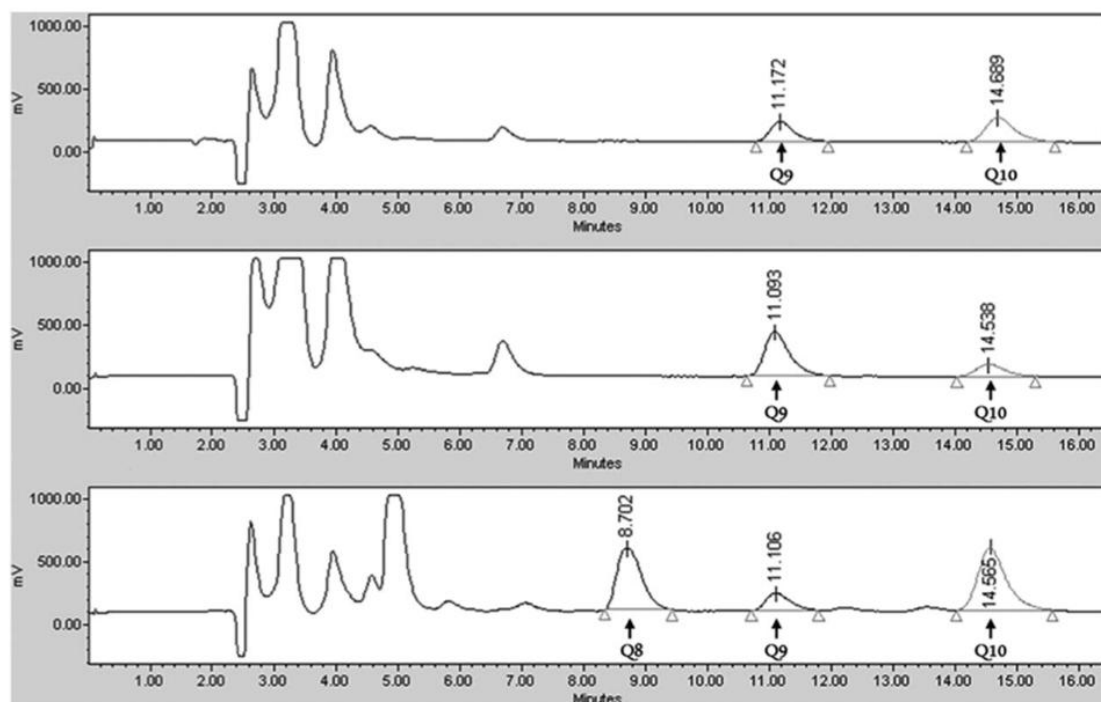


FIG 3 Typical chromatogram of a standard (upper panel), a normal urine (middle panel), and an infected urine (lower panel) samples. Q₉ is the internal standard.

3.1.4. Interferences

When urine samples were contaminated with total blood, CoQ concentrations (expressed as $\mu\text{mol L}^{-1}$) showed a gradual increase as shown in Fig. 2. However, total protein concentration also increased but more remarkably than CoQ values, resulting in a significant decrease in CoQ values expressed as nmol/g pellet protein.

As regards infected urinary samples, two urine samples with positive leukocytes (under microscopy 50–100 leukocytes per field) were analyzed. One of the samples displayed CoQ values higher than the reference values (252 nmol g^{-1} of pellet protein) and the other was within the reference range (92 nmol g^{-1} of pellet protein) (for reference ranges see Table 1). When bacteria were present in urine, an extra peak eluted in the chromatogram, presumably corresponding to Coenzyme Q₈ form, characteristic of bacteria (Fig. 3).

3.1.5. Stability

After 9 months of storage, a variation of 3.5% was observed for a urine CoQ concentration of $0.063 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($0.061 \mu\text{mol L}^{-1}$ before storage and $0.062 \mu\text{mol L}^{-1}$ after 9 months storage), and a variation of 8.2% for a concentration of $0.501 \mu\text{mol L}^{-1}$ was observed ($0.47 \mu\text{mol L}^{-1}$ before storage and $0.44 \mu\text{mol L}^{-1}$ after 9 months storage). Concerning the two urine samples collected under different conditions, no significant CoQ losses were observed when comparing the baseline

conditions (228 nmol L^{-1}) with the 60 and 120 min at room temperature (219 and 209 nmol L^{-1} , respectively).

3.2. Analytical Studies

Chromatograms of the calibrator and of urine samples are presented in Fig. 3. Metrological features are stated in Table 1.

3.3. Reference Values

Urinary CoQ values expressed as nmol/g of pellet protein positively correlated with age ($r = 0.409$; $P = 0.006$). Therefore, age dependent reference intervals were stratified in 2 groups (Table 1).

4. Discussion

Although CoQ analysis in biological samples has proven to be a reliable mean of identifying CoQ deficiency and for CoQ treatment monitoring, no reports on the assessment of the CoQ status of the urinary tract have been published. This analysis has the advantage in that it is a noninvasive procedure, ideal for the assessment of paediatric patients. The optimal preanalytical conditions were established as first morning urine sample with a minimum concentration of 1 g L^{-1} of pellet protein, and with no interferences such as red or white blood cells or bacteria.

First morning urine samples were found to have the least variability for CoQ estimation. Niklowitz et al. [19] reported

that CoQ concentrations in human plasma, red blood cells, platelets, and white blood cells show very little daily variation. Therefore, the impact of a CoQ circadian rhythm on urinary CoQ concentrations would be limited. Under low cell content conditions found in random urine samples, there was a poor correlation between CoQ and protein values, and thus, when the CoQ/protein ratio was calculated, it was more variable than that of the urine samples with $>1 \text{ g L}^{-1}$ of pellet protein concentration. Although it is difficult to establish the minimum urine volume required to reach a pellet protein concentration of $\geq 1 \text{ g L}^{-1}$, we observed that below 30 mL the amount of the collected pellet was very variable. With regards to analytical interferences, blood contamination dramatically increased the total protein value of the collected pellet, but to a lesser extent than the total CoQ concentration. Therefore, samples under these conditions are also not appropriate for CoQ determination. When only leukocytes were present in the urine, CoQ values tended to be higher than noncontaminated urine, however, the increment was not very remarkable, and only observed in one sample suggesting that urine samples with leukocytes lower than 50 per field may be suitable for the analysis. The confirmation of a bacterial infection was demonstrated by microbiological studies in addition to the presence of the characteristic CoQ₈ peak in the HPLC chromatogram [20].

Metrological features for CoQ quantification in different biological samples have been reported by several authors, including our group [3,9]. Hence, HPLC with ED detection is a robust procedure for this purpose, as it was demonstrated by the coefficients of variation and other metrological features obtained in our study.

Urinary epithelial cells are useful for conducting other studies, such as the analysis of mitochondrial DNA mutations [21], indicating that the quantity of mitochondria in these cells may be sufficient for assessing other biological markers, such as CoQ. It is noteworthy that kidney dysfunction is frequently associated with mitochondrial diseases caused by primary-genetic CoQ deficiencies, as has been demonstrated in patients harbouring mutations in *COQ6* and *COQ2* genes [12–14]. The expanding implication of kidney dysfunction in mitochondrial diseases supports the importance of this procedure. Moreover, we cannot exclude the possibility that common renal diseases may also present with a secondary CoQ deficiency, since this association is frequently observed in a large number of other diseases [22,23]. As regards to CoQ therapy monitoring, at present only blood CoQ analysis may be reliable to assess CoQ treatment compliance, but it does not provide information about the quantity of CoQ reaching the target tissues. For ethical and practical reasons, repeated muscle biopsies cannot be undertaken. Thus, for treatment monitoring (in renal diseases) urinary CoQ analysis may represent an important means of assessing CoQ status, especially considering the dramatic clinical improvement of patients with renal disease and CoQ deficiency following CoQ supplementation [12,24,25].

In conclusion, in this study we have established a reliable and reproducible method to determine urinary tract CoQ status. The ability to accurately determine urinary CoQ levels will provide a noninvasive method to assess kidney CoQ state in patients with renal diseases, which at present is not available.

Acknowledgements

This work was funded by research grants from FIS (Instituto de Salud Carlos III and FEDER) PI14/00028 and PI14/01962. The CoQ HPLC procedures have been accredited by the Spanish Agency of Accreditation (ENAC; ISO 15189).

References

- [1] Genova, M. L. and Lenaz, G. (2011) New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *Biofactors* 37, 330–354.
- [2] Trevisson, E., DiMauro, S., Navas, P., and Salviati, L. (2011) Coenzyme Q deficiency in muscle. *Curr. Opin. Neurol.* 24, 449–456.
- [3] Duncan, A. J., Heales, S. J., Mills, K., Eaton, S., Land, J. M., et al. (2005) Determination of coenzyme Q10 status in blood mononuclear cells, skeletal muscle and plasma by HPLC with di-propoxy-coenzyme Q10 as an internal standard. *Clin. Chem.* 51, 2380–2382.
- [4] Quinzii, C. and Hirano, M. (2011) Primary and secondary CoQ10 deficiencies in humans. *Biofactors* 37, 361–365.
- [5] Shults, C. W., Haas, R. H., Passov, D., and Beal, M. F. (1997) Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann. Neurol.* 42, 261–264.
- [6] Mortensen, S.A., Heidt, P., and Sehested, J. (1990) Clinical perspectives in treatment of cardiovascular diseases with coenzyme Q 10. In *Highlights in Ubiquinone Research* (Lenaz, G., Barnabei, O., Rabbi, A., Battino, M. eds.), pp. 226–227, Taylor and Francis, London.
- [7] Lopez, L. C., Schuelle, M., Quinzii, C. M., Kanki, T., Rodenburg, R. J., et al. (2006) Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 1125–1129.
- [8] Quinzii, C., Naini, A., Salviati, L., Trevisson, E., Navas, P., et al. (2006) A mutation in para-hydroxybenzoatepolyprenyl transferase (COQ2) causes a primary coenzyme Q10 deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 345–349.
- [9] Montero, R., Sánchez-Alcázar, J. A., Briones, P., Hernández, A. R., Cordero, M. D., et al. (2008) Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin. Biochem.* 41, 697–700.
- [10] Lagier-Tourenne, C., Tazir, M., López, L. C., Quinzii, C. M., Assoum, M., et al. (2008) ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 661–672.
- [11] Ashraf, S., Gee, H. Y., Woerner, S., Xie, L. X., Vega-Warner, V., et al. (2013) ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J. Clin. Invest.* 123, 5179–5189.
- [12] Heeringa, S. F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A. J., et al. (2011) COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J. Clin. Invest.* 121, 2013–2024.
- [13] Doimo, M., Trevisson, E., Airik, R., Bergdoll, M., Santos-Ocaña, C., et al. (2014) Effect of vanillic acid on COQ6 mutants identified in patients with coenzyme Q10 deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1842, 1–6.
- [14] Scalais, E., Chafai, R., Van Coster, R., Bindl, L., Nuttin, C., et al. (2013) Early myoclonic epilepsy, hypertrophic cardiomyopathy and subsequently a nephrotic syndrome in a patient with CoQ10 deficiency caused by mutations in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2). *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 17, 625–630.



- [15] McCarthy, H. J., Bierzynska, A., Wherlock, M., Ognjanovic, M., Kerecuk, L., et al. (2013) Simultaneous sequencing of 24 genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 8, 637–648.
- [16] Emma, F., Montini, G., Salviati, L., and Dionisi-Vici, C. (2011) Renal mitochondrial cytopathies. *Int. J. Nephrol.*, 2011, 609213.
- [17] Graham, J. C. and Galloway, A. (2001) ACP best practice no. 167: the laboratory diagnosis of urinary tract infection. *J. Clin. Pathol.*, 54, 911–919.
- [18] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.
- [19] Niklowitz, P., Andler, W., and Menke, T. (2006) Coenzyme Q10 concentration in plasma and blood cells: what about diurnal changes? *BioFactors* 28, 47–54.
- [20] Aussel, L., Pierrel, F., Loiseau, L., Lombard, M., Fontecave, M., et al. (2014) Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1837, 1004–1011.
- [21] McDonnell, M. T., Schaefer, A. M., Blakely, E. L., McFarland, R., Chinnery, P. F., et al. (2004) Noninvasive diagnosis of the 3243A4G mitochondrial DNA mutation using urinary epithelial cells. *Eur. J. Hum. Genet.* 12, 778–781.
- [22] Hargreaves, I.P. (2007) Coenzyme Q10 in phenylketonuria and mevalonic aciduria. *Mitochondrion* 7 (Suppl), S175–S180.
- [23] Montero, R., Grazina, M., López-Gallardo, E., Montoya, J., Briones, P., et al. (2013) Coenzyme Q10 deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion* 13, 337–341.
- [24] Rötig, A., Appelkvist, E. L., Geromel, V., Chretien, D., Kadhom, N., et al. (2000) Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet* 356, 391–395.
- [25] Montini, G., Malaventura, C., and Salviati, L. (2008) Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzymeQ10 deficiency. *N. Engl. J. Med* 358, 2849–2850.

Publicació 6

Títol:

A statistical algorithm showing coenzyme Q₁₀ and citrate synthase as biomarkers of mitochondrial activity

Autors:

Dèlia Yubero, Aritz Adín, Raquel Montero, Crsitina Jou, Cecilia Jiménez-Mallebrera, Àngels García-Cazorla, Andrés Nascimento, Maria del Mar O'Callaghan, Julio Montoya, Plácido Navas, Antonia Ribes, Maria Dolores Ugarte, Rafael Artuch.

Referència:

Nature methods (preparat per sotmetre a publicació).

Resum:

El diagnòstic de les malalties mitocondrials es basa en el sumatori d'un conjunt de dades clíniques, bioquímiques, neuroradiològiques, histològiques i moleculars. El múscul esquelètic es considera el teixit més adequat pel diagnòstic d'aquestes malalties per la seva elevada demanda energètica. Actualment els estudis de les activitats dels enzims de la CRM són claus per la orientació bioquímica. Per una interpretació adequada, els valors d'aquestes activitats enzimàtiques es normalitzen pel contingut total de proteïna de l'homogenat de teixit muscular o bé per l'activitat CS, considerada un índex de massa i volum mitocondrial. Durant més de 10 anys, l'estudi de pacients amb sospita de malaltia mitocondrial ens ha permès reunir més de 450 mostres procedents de biòpsies musculars. Així doncs, l'examen estadístic inicial dels valors de CoQ₁₀ i de l'activitat dels enzims de la CRM ens va revelar correlacions elevades entre el CoQ₁₀ i la CS, i del CoQ₁₀ amb altres complexos de la CRM, noció que ens va fer hipotetitzar que la evaluació rutinària del CoQ₁₀ muscular podria ser una nova eina tan per estimar l'activitat mitocondrial (que seria equivalent als valors de l'activitat CS) com per diagnosticar estats de deficiència de CoQ₁₀. Per tant, l'objectiu del present estudi ha estat el desenvolupament d'un algoritme matemàtic, validat per dos procediments estadístics diferents (aglomeratiu i divisiu), que demostra el potencial del contingut de CoQ₁₀ muscular com a biomarcador d'activitat mitocondrial. De fet,

vàrem demostrar que en la majoria de les correlacions estudiades, el nombre de pacients en els que la correlació del CoQ₁₀ amb altres activitats de la CRM mostrava una r superior a 0.95 és superior als obtinguts utilitzant l'activitat CS com a biomarcador d'activitat mitocondrial. Per tant, una catalogació diferent dels pacients segons els valors de CoQ₁₀ podria conduir a aproximacions dianòstiques noves.

A statistical algorithm showing coenzyme Q₁₀ and citrate synthase as biomarkers for mitochondrial activity

Yubero D* (1), Adin A* (3,7), Montero R (1,2), Jou C (1,2), Jiménez-Mallebrera C (1,2), García-Cazorla A (1,2), Nascimento A (1,2), O'Callaghan MM (1,2), Montoya J (2,4), Briones P (5), Navas P (2,6), Ribes A (2,5), Ugarte MD** (3,7), Artuch R** (1,2).

(1) Clinical Biochemistry Department, Institut de recerca Pediàtrica-Hospital Sant Joan de Déu (IRP-HSJD), Barcelona, Spain

(2) Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERER), ISCIII, Spain

(3) Department of Statistics and O.R., Public University of Navarre

(4) University of Zaragoza

(5) Institut de Bioquímica Clínica

(6) Universidad Pablo de Olavide

(7) Institute for Advanced Materials (InaMat), Public University of Navarre

*Both authors equally contributed to this work

**Co-corresponding authors

Corresponding authors:

Dr. Rafael Artuch

Clinical Biochemistry Department

Hospital Sant Joan de Déu and CIBERER

Passeig Sant Joan de Déu, 2

08950 Esplugues, Barcelona, Spain

E-mail: rtuch@hsjdbcn.org

Dra. Maria Dolores Ugarte

Department of Statistics and O.R.

Public University of Navarre

Pamplona, Spain

E-mail: lola@unavarra.es

Abstract

Laboratory data interpretation for the assessment of complex biological systems remains a great challenge, as occurs in mitochondrial function research studies. The classical biochemical data interpretation of patients versus reference values may be insufficient, and in fact the current classifications of mitochondrial patients are still done on basis of probability criteria. We have developed and applied a mathematic agglomerative algorithm to search for correlations among the different biochemical variables of the mitochondrial respiratory chain in order to identify populations displaying correlation coefficients > 0.95 . We demonstrated that coenzyme Q₁₀ may be a better biomarker of mitochondrial activity than the citrate synthase activity. Furthermore, the application of this algorithm may be useful to re-classificate mitochondrial patients or to explore associations among other biochemical variables from different biological systems.

Keywords: coenzyme Q₁₀; mitochondrial disorders; mitochondrial activity; muscle biopsy; statistical algorithm.

Abbreviations: Coenzyme Q₁₀ (CoQ), citrate synthase (CS), mitochondrial respiratory chain enzymes (MRC).

1. INTRODUCTION

Mitochondrial disease diagnosis is a complex process that relies on clinical, biochemical, neuroimaging, histological, and molecular data. Skeletal muscle is considered the most suitable tissue for the diagnosis of these disorders because of its availability and high metabolic rate. Biochemical measures of mitochondrial respiratory chain enzyme activities (MRC) are crucial for clinical diagnosis. The activities of MRC complexes (I-IV) are assayed spectrophotometrically, and the results are normalized to the total muscle protein content or to the activity of the mitochondrial matrix enzyme citrate synthase (CS), which is commonly used as an index of mitochondrial abundance [1]. Normalization to CS activity will facilitate the detection of partial enzymatic defects in diseases with compensatory mitochondrial proliferation [2], while normalization to total proteins could unmask an MRC enzymatic defect in some cases of mitochondrial DNA depletion syndromes that are associated with reduced CS activities [3-6].

Coenzyme Q₁₀ (CoQ) is a lipid with a key role in mitochondrial oxidative phosphorylation because it is essential for electron transport from complex I and II to complex III of the MRC. The link between CoQ deficiency and dysfunction of complexes I + III and II + III is expected because low CoQ availability in mitochondria would impair the electron transfer essential for ATP production [7-10]. Muscle CoQ concentrations have been demonstrated to be associated with CS activity [10,11], as well as with other mitochondrial dysfunction biomarkers, such as the percentage of subsarcolemmal mitochondrion aggregates [10]. Furthermore, it has been suggested that total muscle CoQ is the best predictor of an MRC abnormality [12]. These findings strongly support the hypothesis that routine quantitative evaluation of muscle CoQ might be a new tool for both estimating mitochondrial activity in muscle biopsies and diagnosing CoQ deficiency states [10,12].

With this background, our aim was to develop and apply an exploratory statistical procedure to assess muscle CoQ content and CS activity as biomarkers of mitochondrial activity evaluated by the analysis of MRC enzyme activities. After the initial statistical assessment, subpopulations of individuals displaying a high linear correlation coefficient among the different biochemical variables were identified.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Patients

During the last 15 years, we have studied 448 muscular biopsies from patients suspected of mitochondrial disorders (age range 1 month-16 years; mean: 3.6 years). Of this population, 184 showed normal results for all MRC enzymes, CoQ and citrate synthase activities. Data were compared with those of a previously reported control population (N=37; age range 2-16 years; average

9.2 years) [11]. For a subgroup of 144 cases, clinical, biochemical, histopathological, neuroimaging and molecular data are available on request.

2.2. Ethical issues

The study was approved by the ethical committees of the different centers involved. Patients or their parents signed informed consent, and tissue samples from patients and controls were obtained according to the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2001.

2.3. Biochemical studies

Muscle biopsies were taken and prepared according to standard procedures. NADH:cytochrome c oxidoreductase (complex I+III), succinate:cytochrome c reductase (complex II+III), succinate dehydrogenase (complex II), ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (complex III), cytochrome c oxidase (complex IV) and CS activities were determined using described spectrophotometric methods [13,14]. Enzyme activity results were expressed as mU/mg protein and mU/CS units. Total muscle CoQ levels were determined by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC, Waters, MA, USA) with electrochemical detection (Coulchem II, ESA, MA, USA) [11]. The CoQ values were expressed as nmol/gram of total protein content measured by the Lowry method [15].

2.4. Statistical methods

Pearson linear correlation coefficients were initially computed between MRC enzyme activities, CS activity and CoQ content in muscle homogenates from patients. Statistical significance was evaluated using $p < 0.01$. Calculations were performed using the R program (version 3.2.3). See, for example Ugarte et al. (2015) [16].

Two statistical procedures were developed to further explore the correlations detected amongst the different biochemical variables. In particular, two algorithms were implemented to identify subpopulations of individuals where a high correlation was reached ($r > 0.95$).

1) Agglomerative procedure: Initial linear axes were found using the robust algorithm developed by García-Escudero et al. (2009) [17], which was specifically designed to detect linear clusters. Then, an iterative procedure was implemented by adding individuals to the initial axes until a fixed high correlation was achieved. The procedure was specifically constructed as follows.

Let X and Y be the variables of interest (that initially showed linear association), and let $M^{(0)}$ be the set consisting of the three nearest points to the simple regression line $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$ (calculated by ordinary least squares) fitted over the individuals selected by the linear clustering method implemented by García-Escudero et al. (2009) [16]; i.e., the three individuals with the smallest residuals $|\hat{\varepsilon}_i| = |Y_i - \hat{Y}_i|$ are selected. Next, a "correlation loss measure" between the set $M^{(0)}$ and any other individual i is defined as

$$CLM(M^{(0)}, i) = \rho(X_{M^{(0)}}, Y_{M^{(0)}}) - \rho(X_{M^{(0)} \cup \{i\}}, Y_{M^{(0)} \cup \{i\}}),$$

where $\rho(X_{M^{(0)}}, Y_{M^{(0)}})$ is the Pearson's correlation coefficient between the variables X and Y within the set $M^{(0)}$.

1.- Let $M^{(1)} = M^{(0)} \cup \{i^*\}$ be a new set where i^* is the individual that verifies

$$CLM(M^{(0)}, i^*) \leq CLM(M^{(0)}, i), \quad \text{for all } i$$

i.e., i^* is the individual with the smallest correlation loss.

2.- Step 1 is repeated while $\rho(X_{M^{(k)}}, Y_{M^{(k)}}) \geq r^*$, where r^* is the desired correlation to be reached.

2) Divisive procedure: Unlike the agglomerative procedure, there is no need to define an initial axis because all of the individuals are considered as starting points in this method. Then, an iterative procedure is implemented by deleting one case (individual) at each step until a fixed high correlation is achieved.

More explicitly, the procedure can be described as follows:

Let $M^{(0)}$ be the set of all individuals in our target population. We define the "correlation gain measure" between the set $M^{(0)}$ and the individual i as

$$CGM(M^{(0)}, i) = \rho(X_{M^{(0)} - \{i\}}, Y_{M^{(0)} - \{i\}}) - \rho(X_{M^{(0)}}, Y_{M^{(0)}}),$$

where $\rho(X_{M^{(0)} - \{i\}}, Y_{M^{(0)} - \{i\}})$ is the Pearson's correlation coefficient between the variables X and Y within the set $M^{(0)}$ without the i individual.

1.- Let $M^{(1)} = M^{(0)} - \{i^*\}$ be a new set where where i^* is the individual that verifies

$$CGM(M^{(0)}, i^*) \geq CLM(M^{(0)}, i), \quad \text{for all } i$$

that is, the individual with the largest correlation gain.

2. Step 1 is repeated k times until $\rho(X_{M^{(k)}}, Y_{M^{(k)}}) \geq r^*$, where r^* is the desired correlation to be reached.

Both algorithms were implemented in R (version 3.2.3). After the application of the two algorithms, subpopulations displaying high correlations were identified.

	CoQ	CS
CoQ	-	$r=0.455$ (N=446); $p<0.0001$
CS	$r=0.455$ (N=446); $p<0.0001$	-
CI+III	$r=0.334$ (N=422); $p<0.0001$	$r=0.159$ (N=422); $p=0.257$
CII+III	$r=0.410$ (N=428); $p<0.0001$	$r=0.227$ (N=428); $p<0.018$
CII	$r=0.549$ (N=334); $p<0.0001$	$r=0.479$ (N=334); $p<0.0001$
CIII	$r=0.331$ (N=296); $p<0.0001$	$r=0.297$ (N=295); $p<0.016$
CIV	$r=0.443$ (N=446); $p<0.0001$	$r=0.397$ (N=296); $p<0.0001$

Table 2. Correlation data (Pearson test) among muscle CoQ (nmol/g protein), CS and MRC activities (Units/g of protein). From the whole population (n=448), observations with missing data and potential outliers were removed, and the number of individuals identified for computing both agglomerative and divisive procedures and correlation coefficients and significance values are shown.

3. RESULTS

Biochemical results in muscle biopsies in the entire cohort of patients together with our reference values are stated in Table 1.

From the whole population (n=448), observations with missing data and potential outliers were removed, and the number of individuals identified for computing both agglomerative and divisive procedures, correlation coefficients and significance values are stated (Table 2). Data were initially normalized to muscle total protein concentrations. CoQ correlation coefficients with all of the MRC enzyme activities were higher compared with those obtained between CS and the other MRC enzymes (Table 2). When the CoQ concentrations and MRC enzyme activities were normalized to CS activity values, the highest correlation coefficient was observed between CoQ and complex II+III ($r=0.448$; $p<0.0001$). Then, in the whole population, we used CoQ as a normalizer of the CS and MRC activities. We saw that the MRC complexes that correlate more with CS activity were III and IV ($r=0.602$ and $r=0.556$, $p<0.0001$).

	N	Range (SD)	Mean	Reference values
CoQ	448	0.1-1253 (114)	185	110-480 nmol/gr protein
CI+III	429	1-425 (23)	19	12-56 nmol/min*mg protein
CII+III	434	0.50-142 (9)	9	7-24 nmol/min*mg protein
CII	339	1-86 (6)	6	4-10 nmol/min*mg protein
CIII	305	0.1-1180 (77)	75	55-259 nmol/min*mg protein
CIV	299	4-215 (40)	82	59-170 nmol/min*mg protein
CS	448	12.9-522 (63)	132	71-200 nmol/min*mg protein
CoQ / CS	436	0.14-49 (3)	4	2.68-8.40 nmol/CS Units
CI+III / CS	443	0.1-826 (109)	160	107-560 nmol/CS Units
CII+III / CS	447	3.0-877 (60)	76	60-149 nmol/CS Units
CII / CS	265	7.0-757 (48)	46	33-69 nmol/CS Units
CIII / CS	240	0.1-1720 (290)	511	498-1760 nmol/CS Units
CIV / CS	310	100-1872 (301)	669	503-1300 nmol/CS Units

Table 1. Biochemical data from the whole initial cohort (n=448). The range, standard deviation (SD) and mean of CoQ and MRC activities is given, expressed either by gram of protein or CS units. Reference values are also stated.

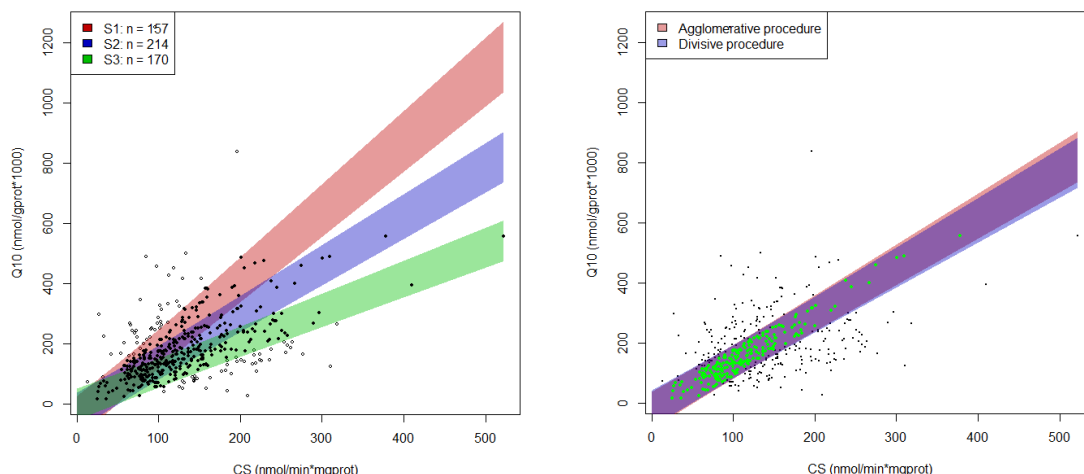


Figure 1. A) Three possible clusters identified by the agglomerative method. **B)** The cluster selected was the one with the highest number of individuals (blue). Good agreement was observed between agglomerative and divisive methods.

Agglomerative and divisive algorithms:

When applying the agglomerative procedure, three initial linear axes were used to find the corresponding clusters of individuals with a high correlation ($r > 0.95$) between the variables CoQ and CS. The cluster with the highest number of individuals was chosen. The divisive method identified essentially the same subpopulation (98% of individuals in common, $n = 214$) (Figure 1).

We started with MRC enzyme activities and their association with either CS or CoQ. In the agglomerative method, three initial linear axes were considered, except for CS and complexes I+III and II+III, in which the agglomerative algorithm did not provide any sensible results and only the divisive method was applied. We finally selected the population with the highest number of individuals and compared it with those cases selected by the divisive method, which offered only one solution. Most MRC enzyme data showed that, when correlated with CoQ, populations with a higher number of individuals were detected (Table 3), especially for CoQ-dependent enzymes (CI+III and CII+III). The percentage of cases sharing the same correlation ($r > 0.95$) using agglomerative and divisive methods was also higher for CoQ when compared with CS, except for complex III (Table 3).

MRC enzyme activities	CoQ (n and %)	CS (n and %)
CI+III	150 (85 %)	129 (- %)
CII+III	180 (93 %)	140 (- %)
CII	169 (98 %)	149 (97 %)
CIII	123 (100 %)	129 (100 %)
CIV	139 (86 %)	128 (85 %)

Table 3. Number of patients identified as having a correlation coefficient > 0.95 among the different MRC enzyme activities vs CoQ or CS, and the degree of agreement between the agglomerative and divisive methods in the number of calculated individuals, except for CS, Complexes I+III and II+III, in which the agglomerative algorithm did not provide any sensible results and only the divisive method was applied.

4. DISCUSSION

This is the first report to analyze CoQ and other MRC biomarkers in a large cohort of samples. We have developed a statistical algorithm to assess the feasibility of using both CoQ and CS as biomarkers for mitochondrial activity.

After applying the first statistical approach to the different biochemical variables (Pearson single correlation test) across the whole cohort of patients, several observations were made: 1) Correlation of CoQ values with CS was high. 2) Correlation of CoQ values and MRC was strongest when MRC were correlated with CS activity. 3) By using different normalization strategies for MRC (with either CS or CoQ values), as expected, CoQ was highly correlated with CII+III related with CS activity, and CS showed a high correlation coefficient with both CIII and IV activities related to CoQ content. Thus, differences between the association of CoQ and CS with the different MRC activities were evident.

After these preliminary observations, the next step was to develop the algorithms to further explore these associations. We did not consider age as a potential confounding variable because it has been suggested that it is not related to the activities of most MRC enzymes and CS activities [18].

The initial step of the agglomerative method looked for robust linear clusters to determine initial linear directions to start the iterative steps. Although it only provided a single linear cluster as the optimal solution, we decided to explore three different linear cluster solutions and applied the iterative steps to these three potential solutions. The cluster with the highest number of individuals was chosen. To further validate the agglomerative algorithm, we compared the final results with a divisive method, which offered a unique solution from the whole cohort of patients. Interestingly, the

degree of agreement between the solutions provided by the two algorithms was very high (see Table 3). The algorithm was then able to provide subpopulations of individuals with a high linear correlation coefficient between the variables of interest. In our case, a single subpopulation seemed to be the most reasonable solution.

We chose a correlation coefficient value of 0.95 because it is remarkably high when we consider biological variables of this complexity. Notably, the number of cases where this correlation was detected was remarkably high, especially for CoQ and CS correlation, supporting the hypothesis that CoQ may be employed, like CS, as a marker for mitochondrial activity. Therefore, the normalization of MRC activities to CoQ seems advisable for a better classification of mitochondrial patients.

From the data shown in table 3, we observed, in terms of number of individuals displaying a correlation > 0.95 , that CoQ was a better marker than CS for CI+II, CII+III and CII activities, while CS was better for CIII and similar for CIV activities. Furthermore, in all cases (except for CS, CI+III and II+III), the degree of agreement between agglomerative and divisive methods was very high, supporting the usefulness of this new statistical approach.

Although a biological explanation is difficult, the proposed supramolecular organization of MRC could illustrate why CoQ may be a better mitochondrial biomarker than CS. The individual MRC complexes (except complex II) can associate with different supercomplexes. Until now, the proposed supercomplexes consisted of the respirasome (complexes I, III, and IV), complexes I and III and complexes III and IV. Supercomplexes are presumed to be functional entities, but their exact roles are in constant debate. By genetic modulation of interactions between complexes I and III and between complexes III and IV, we show that these associations define a dedicated CoQ pool and that SC assembly is a dynamic mechanism that organizes electron flux to optimize the use of available substrates [19].

In conclusion, we have developed a new algorithm for exploring associations among complex biological variables. In this specific example, we demonstrate that CoQ may be used, like CS, as biomarker for mitochondrial activity. Hence, its routine determination in the research of mitochondrial diseases seems advisable. Potential applications of the agglomerative method may be the reclassification of patients according to CoQ values, which might lead to a better understanding of mitochondrial disorders. Furthermore, this algorithm may be employed to identify populations displaying high correlations among other biological variables.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (Explora Ciencia SAF2013-50139-EXP, FIS PI14/00005, PI14/00028) and FEDER Funding Program from the European Union. The "Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. We are in debt to the Biobanc de l'Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació, part of the Spanish Biobank Network of ISCIII for sample procurement.

REFERENCES

- [1] Reisch, A.S. & Elpeleg, O. Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of TCA cycle enzymes and PDHc. *Methods. Cell. Biol.* **80**, 199-222 (2007).
- [2] Wen, B., et al. Increased muscle coenzyme Q10 in riboflavin responsive MADD with ETFDH gene mutations due to secondary mitochondrial proliferation. *Mol. Genet. Metab.* **109**, 154-160 (2013).
- [3] Spinazzi, M. et al. Optimization of respiratory chain enzymatic assays in muscle for the diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion.* **11**, 893-904 (2011).
- [4] Sarzi, E. et al. Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J. Pediatr.* **150**, 531-5344, 534.e1-6 (2007).
- [5] Tesarova, M. et al. Mitochondrial DNA depletion in Alpers syndrome. *Neuropediatrics.* **35**, 217-223 (2004).
- [6] Montero, R. et al. Coenzyme Q10 Deficiency Study Group. Coenzyme Q10 deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion.* **13**, 337-341 (2013).
- [7] Lamperti, C. et al. Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology.* **60**, 1206-1208 (2003).
- [8] Taylor, R.W., Schaefer, A.M., Barron, M.J., McFarland, R. & Turnbull, D.M. The diagnosis of mitochondrial muscle disease. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 237-245 (2004).
- [9] Lalani, S.R. et al. Isolated mitochondrial myopathy associated with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Arch. Neurol.* **62**, 317-320 (2005).
- [10] Miles, M.V., et al. Systematic evaluation of muscle coenzyme Q10 content in children with mitochondrial respiratory chain enzyme deficiencies. *Mitochondrion.* **8**, 170-180 (2008).
- [11] Montero, R. et al. Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin. Biochem.* **41**, 697-700 (2008).
- [12] Miles, L. et al. Ubiquinol: a potential biomarker for tissue energy requirements and oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* **360**, 87-96 (2005).
- [13] Rustin, P. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta.* **228**, 35-51 (1994).
- [14] Grazina, M.M. Mitochondrial respiratory chain: biochemical analysis and criterion for deficiency in diagnosis. *Methods. Mol. Biol.* **837**, 73-91 (2012).
- [15] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- [16] Ugarte, M.D., Militino, A.F. & Arnholt, A.T. *Probability and Statistics with R*. Second Edition. CRC Press (Taylor & Francis Group) by Chapman and Hall, Boca Raton, London, New York (2015).
- [17] García-Escudero, L.A., Gordaliza, A., San Martín, R., Van Aelst, S. & Zamar, R. Robust linear clustering. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, **71**: 301-318 (2009).
- [18] Lefai, E., et al. Enzymatic activities of mitochondrial respiratory complexes from children muscular biopsies. Age-related evolutions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1228**, 43-50 (1995).
- [19] Lapuente-Brun, E., et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science.* **340**, 1567-1570 (2013).

DISCUSSIÓ

En l'entorn clínic, la prioritat que ens plantejem és la millora del diagnòstic de les malalties mitocondrials associades a defectes de CoQ₁₀. La recopilació de dades clíniques, bioquímiques, histoquímiques, enzimàtiques i moleculars és imprescindible per assolir l'objectiu principal d'aquesta tesi, que consisteix en el diagnòstic de pacients amb deficiències de CoQ₁₀ a través de l'estudi sistemàtic d'aquest en diverses mostres biològiques. Hem assolit aquest objectiu a través d'un conjunt d'estudis que formen part d'una xarxa nacional (promoguda principalment pel CIBERER, el centre d'investigació biomèdica en xarxa de malalties rares del nostre país) i internacional, encarregada d'impulsar la recerca bàsica i la que correspon a l'àmbit més aplicat, orientada al pacient. La contribució dels treballs recopilats en la present tesi implica avenços pel diagnòstic de les deficiències de CoQ₁₀. Tanmateix, tres dels treballs publicats pertanyen al domini internacional, i la resta han estat realitzats en cooperació amb altres grups CIBERER, tan de l'àrea del diagnòstic com de la recerca bàsica, aportant una vessant translacional i col·laborativa als nostres resultats.

Com a reflexió general, una de les troballes més interessants ha sigut que el defecte de CoQ₁₀ no està present tan sols en les malalties mitocondrials, sinó que l'hem observat en altres malalties com ara les lisosomals, en canalopaties o en el defecte del transportador de glucosa al cervell, advertint noves possibilitats per esclarir aspectes fisiopatològics que podrien ser claus en aquestes malalties.

1. Estudi de l'estat del coenzim Q₁₀ en una cohort gran de pacients, amb diagnòstic molecular definitiu, analitzada durant els últims anys en diversos centres europeus.

Des dels primers pacients amb deficiència de CoQ₁₀ (Ogasahara et al., 1989) fins l'actualitat, l'augment de les descripcions de nous pacients i nous gens ha derivat en una ampliació del rang de manifestacions clíniques (Emmanuele et al., 2012) (veure Taula 1 de la introducció). Amb tot, la dificultat de reconèixer patrons clínics i de discernir entre deficiències de CoQ₁₀ primàries i secundàries complica el procés diagnòstic. En circumstàncies patològiques, on es produeix una disminució del CoQ₁₀, la possibilitat de que aquesta mancança pugui intervenir en la fisiopatologia de la malaltia és important a l'hora de considerar noves alternatives terapèutiques en malalties sense tractament a curt termini.

Considerant les deficiències primàries de CoQ₁₀, actualment hi ha 77 mutacions patològiques descrites (HGMD-Professional 2016.1[®]) en el conjunt dels diferents gens de la biosíntesi del CoQ₁₀, en més de 113 pacients (Emmanuelle et al., 2012). No obstant això, la deficiència primària de CoQ₁₀ és molt infreqüent dins de les malalties mitocondrials en general, i se sospita que la majoria dels defectes de CoQ₁₀ establerts per l'anàlisi bioquímic d'aquesta molècula en plasma, múscul i fibroblasts serien deguts a altres causes alienes a la via de síntesi del CoQ₁₀. En un percentatge important de pacients amb deficiència de CoQ₁₀ no es troben mutacions als gens directament relacionats amb la síntesi del CoQ₁₀, per això es va començar a intuir que les deficiències secundàries de CoQ₁₀ eren bastant més freqüents i s'han publicat nombrosos estudis que descriuen malalties associades a una reducció de CoQ₁₀ (veure Taula 2 de la introducció), tan en sang com en diferents tipus cel·lulars. És més, l'alteració de CoQ₁₀ no es troba només en malalties mitocondrials, ja que també s'ha pogut observar en altres condicions aparentment no relacionades amb el metabolisme energètic mitocondrial (Aeby et al., 2007; Quinzii et al., 2005; Baruteau et al., 2014; Haas et al., 2009; Balreira et al., 2014). Si bé és cert que el CoQ₁₀ participa en altres funcions claus pel metabolisme cel·lular que no són estrictament energètiques i que es troben fora del mitocondri (Bentinger et al., 2010), les implicacions que això podria tenir en els mecanismes patogènics de malalties tan diverses són difícils de discernir. Un dels avenços més

notables que s'han experimentat en els darrers anys és la identificació de mecanismes complexos de comunicació entre diferents orgànuls cel·lulars, la qual cosa implica que probablement una alteració en un orgànul podria tenir implicacions en altres vies metabòliques sense relació aparent.

L'avinencesa de disposar de cohorts grans de pacients ens permet analitzar dades adquirint una perspectiva més global i és la base sobre la qual es genera el resultat del primer objectiu de la present tesi. Gràcies a una col·laboració entre centres nacionals en l'àmbit del CIBERER i altres centres europeus, demostrem que la deficiència secundària de CoQ₁₀ és una troballa comú en malalties que afecten tan al sistema OXPHOS com a malalties no mitocondrials, a més a més amb una freqüència molt semblant. El CoQ₁₀ està localitzat dins i fora del mitocondri (Crane et al., 2007; Navas et al., 2007), i encara que la seva funció primordial està especialment lligada al metabolisme energètic, també es coneix que la resta de funcions en les que participa són suficientment importants com per a que un variació de les fraccions cel·lulars del CoQ₁₀ alterin l'estat fisiològic cel·lular i contribueixin a la fisiopatologia de certes malalties. De fet, i tenint en compte que és un lípid amb funcions antioxidants, el CoQ₁₀ desenvolupa un paper clau en la protecció davant l'estrès oxidatiu en les membranes cel·lulars i sobre les lipoproteïnes del transport del colesterol a la sang, pel que té una implicació molt important no tan sols en malalties rares, sinó també en malalties prevalents com les cardiovasculars, diabetis o malalties neurodegeneratives (Yubero et al., 2015). A més, existeixen diferents mecanismes (s'hipotetitza que serien polimorfismes en la via de síntesi del CoQ₁₀ així com en la regulació d'aquesta via, complexa i parcialment desconeguda) que podrien desregular la biosíntesi del CoQ₁₀ o bé augmentar la seva metabolització (González-Mariscal et al., 2014). De fet, s'han associat canvis polimòrfics que no justifiquen una malaltia monogènica al gen *COQ2*, associats a l'atròfia sistèmica múltiple (Multiple-System Atrophy Research Collaboration, 2013).

Pel que fa referència a les malalties mitocondrials degudes a defectes d'OXPHOS, la reducció de l'activitat del complex II+III de la CRM, que per la seva activitat depèn del CoQ₁₀, només apareix en pacients amb desordres d'OXPHOS, la qual cosa suggereix que en individus amb malalties alienes al sistema OXPHOS el valor de CoQ₁₀ s'alteraria per un desequilibri de la fracció de CoQ₁₀ extramitocondrial. La

severitat de la reducció dels valors de CoQ₁₀ no permet distingir els tipus de malalties entre mitocondrials o no mitocondrials; però és interessant que la reducció d'activitat del complex II+III de la CRM va acompanyada de percentatges de descens dels valors de CoQ₁₀ vora el rang de 40-50%. Per contra, els casos amb reducció de CoQ₁₀ més profunda (90%), corresponen a síndromes de depleció del mtDNA i s'explicarien per la disminució del nombre i volum mitocondrial en el context d'una disfunció mitocondrial generalitzada (Montero et al., 2013; Navarro-Sastre et al., 2012). La correcció de l'activitat dels enzims de cadena respiratòria per l'activitat CS justificaria aquesta normalitat dels resultats de l'activitat enzimàtica del CII+III.

A part de les malalties prèviament descrites associades a deficiències de CoQ₁₀ (taula 2A de la introducció), com a dada interessant hem observat una reducció secundària dels valors de CoQ₁₀ en altres defectes genètics directament relacionats amb el sistema OXPHOS (concretament als gens *BSCL1*, *EARS2* i *NDUFS4*). En aquests casos, el dany en les proteïnes estructurals (*NDUFS4*), d'ensamblatge (*BSCL1*) o bé de traducció del mtDNA (*EARS2*) produirien una afectació directa a la organització i funcionament dels SCs, que modificaria la compartimentació de les fraccions del CoQ₁₀ associades als SCs, causant previsiblement una alteració de l'estat intracel·lular d'aquesta molècula (Lapiente-Brun et al., 2013). Ara bé, aquesta hipòtesi s'hauria de confirmar amb més estudis experimentals.

També malalties no mitocondrials sovint poden associar reducció del CoQ₁₀, com en el cas de la malaltia de Niemann Pick C. Aquesta malaltia seria el paradigma dels defectes extramitocondrials que causen una alteració secundària del CoQ₁₀, ja que les acumulacions intracel·lulars de colesterol causats per mutacions en els gens *NPC1* o *NPC2* –que codifiquen proteïnes participants en el tràfic del colesterol i altres lípids– produirien una regulació negativa de la via del mevalonat (concretament a nivell de l'enzim 3-OH-3-metilglutarilCoA reductasa), responsable d'una disminució a la síntesi d'un dels precursors fonamentals del CoQ₁₀ que és el farnesil-PP (Buján et al., 2014). És interessant destacar en aquest punt, encara que no és un objectiu d'aquesta tesi, que els inhibidors farmacològics d'aquest enzim (estaines), usats pel control de la hipercolesterolèmia, també poden causar deficiències secundàries de CoQ₁₀ en individus susceptibles (revisat a Yubero et al., 2015).

Especialment interessant fou un cas amb una encefalopatia epilèptica on vam trobar una deficiència destacable de CoQ₁₀ en múscul i, de fet, la primera sospita fou una causa primària associada a gens de la síntesis del CoQ₁₀. Finalment, mitjançant l'anàlisi de l'exoma complet realitzat a l'Hospital de la Vall d'Hebron, es va assolir el diagnòstic amb una mutació *de novo* al gen *SCN2A*. Segons l'efecte de les mutacions, els pacients presenten des de síndromes epilèptics neonatals familiars fins a encefalopaties epilèptiques més severes, d'herència dominant (Heron et al., 2002; Berkovic et al., 2004; Schwarz et al., 2016). El gen codifica per Na(v)1.2, un canal de sodi neuronal depenent de voltatge. Estudis en mutacions de guany de funció indiquen que un increment de l'influx de Na⁺ produiria hiperexcitabilitat neuronal i explicaria la disfunció de xarxes cerebel·loses o corticals que causarien els símptomes clínics als pacients (Schwarz et al., 2016). No s'han estudiat ni hipotetitzat alteracions del metabolisme mitocondrial en aquests pacients, de manera que en aquest moment estem analitzant els fibroblasts de la pacient així com silenciant el gen *SCNA2* en models cel·lulars per valorar si la deficiència de CoQ₁₀ és només un epifenomen de la malaltia o bé si està directament relacionat amb un defecte secundari a la biosíntesi del CoQ₁₀, o d'un augment en la seva degradació.

Recentment s'han associat deficiències de CoQ₁₀ en dues famílies amb mutacions en el gen *ANO10* (Balreira et al., 2014), que fenotípicament presenten una atàxia cerebel·losa i atròfia (OMIM#613728). L'anocamina 10 (ANO10) pertany a la família proteica de l'anocamina, les quals sembla que codifiquen per canals de clor activats per calci específics de teixit. Tot i que ANO10 s'expressa majoritàriament al cervell, es desconeixen els mecanismes patològics de la malaltia, i menys les causes de la deficiència de CoQ₁₀ en els dos pacients descrits per Balreira i col·laboradors. Però s'ha demostrat un efecte positiu de la suplementació amb CoQ₁₀ en aquests individus, on en un d'ells varen desaparèixer les convulsions. S'ha postulat que l'atàxia cerebel·losa en pacients amb deficiència d'ANO10 podria ser deguda a senyalització alterada del calci en les cèl·lules de Purkinje (Duran et al., 2011). La senyalització per calci és important per la funció mitocondrial (Logan et al., 2014), així que aquestes troballes obren una nova línia de recerca que podria associar diverses canalopaties amb defectes d'aquest lípid essencial al mitocondri.

En resum, la deficiència secundària de CoQ₁₀ és un descobriment comú no només en malalties mitocondrials, sinó també en altres tipus de malalties no mitocondrials. Com a nova línia de recerca, hipotetitzem que els casos de variació de l'estat del CoQ₁₀ associats a alteracions d'OXPPOS podrien considerar-se com un mecanisme d'adaptació per mantenir un equilibri del sistema, tal com hem pogut demostrar en les deficiències de PDH. També s'ha d'advertir la importància fisiopatològica que pot tenir el CoQ₁₀ en la resta de malalties mitocondrials i no mitocondrials, on possiblement la pèrdua del balanç antioxidatiu i l'increment de ROS formarien part dels mecanismes patològics. Encara que la deficiència de CoQ₁₀ no és una condició universal en aquestes malalties i les seves causes romanen desconegudes, el paper biològic tan complex que exerceix aquest component en diferents rutes i funcions biològiques suggereix que podria tenir implicacions fisiopatològiques importants. Per tant, serà necessari profunditzar en la investigació de les possibles causes d'alteració secundària d'aquest component, especialment perquè alguns pacients podrien beneficiar-se de la suplementació amb CoQ₁₀.

2. Identificar noves causes d'alteracions de l'estat del coenzim Q₁₀, plantejant aspectes fisiopatològics i terapèutics.

Amb l'objectiu anterior, la primera observació ens indica que hi ha moltes causes per descobrir que associen defectes secundaris del CoQ₁₀, no tan sols mitocondrials sinó també afectant a altres òrgans. La identificació de noves causes d'alteració de l'estat del CoQ₁₀ planteja aspectes fisiopatològics i terapèutics importants. Hem assolit aquest objectiu amb el reconeixement, per primera vegada, d'una alteració de les concentracions del CoQ₁₀ en la deficiència de piruvat deshidrogenasa i en la deficiència del transportador de glucosa cerebral GLUT-1, així com també hem confirmat que en les mucopolisacaridosis tipus III la deficiència de CoQ₁₀ en plasma és una troballa quasi universal.

2.1. Deficiència de PDH

En el primer treball es presenten dos pacients pediàtrics amb diagnòstic de deficiència de PDH (amb mutacions en els gens *PDHA1* i *PDHB*, respectivament). La PDH és un complex multienzimàtic format per diferents subunitats que catalitza la descarboxilació oxidativa del piruvat format a la glicòlisi a acetil-CoA. L'acetil-CoA s'incorpora al cicle de Krebs, element central del metabolisme energètic i font de la màxima producció d'equivalents reduïts. Ambdós pacients presentaven característiques comunes: un fenotip molt similar amb atàxia, acidosi làctica amb evolució episòdica, complicant la malaltia fins a una evolució fatal. També presentaven un increment de les concentracions del CoQ₁₀ i del nombre de mitocondris en fibroblasts i múscul, amb presència de mitocondris poc eficients i nivells elevats d'enzims antioxidants. L'augment del valor de CoQ₁₀ tan en teixit muscular com en fibroblasts corresponia a un increment de la massa mitocondrial, que denotava disfunció mitocondrial amb baixa eficiència de biosíntesi d'ATP.

El contingut de CoQ₁₀ als mitocondris està en equilibri amb els complexos de la CRM, contribuint al seu superensamblatge (Lapuente-Brun et al., 2013), a la eficiència d'OXPHOS i limitant la producció de ROS (Genova & Lenaz, 2014). El CoQ₁₀ de la CRM necessita d'altres proteïnes per realitzar el transport d'electrons i aleshores prevenir una fuga d'aquests, que incrementarien la producció de ROS

(Barros et al., 2005). Així doncs, el mecanisme que probablement explica l'alteració dels valors del CoQ₁₀ estaria relacionat amb la fuga d'electrons observada en aquests pacients, en els quals també s'ha detectat una sobreexpressió d'enzims antioxidatius per compensar un probable increment de ROS.

En definitiva, l'increment dels mitocondris, i el corresponent augment en la concentració de CoQ₁₀, tractaria de compensar la manca d'acetil-CoA i contribuir a l'activitat antioxidant per prevenir el dany oxidatiu. El desequilibri del CoQ₁₀, tan a la baixa com a l'alça, pot condicionar mecanismes cel·lulars de compensació segons el tipus de disfunció metabòlica que està tenint lloc al context cel·lular.

2.2. Deficiència del transportador de glucosa al cervell (GLUT-1)

En el segon treball, descrivim una pacient que presentava una associació entre la deficiència del transportador de glucosa cerebral GLUT-1 i la disminució secundària de CoQ₁₀. En la G1DS, el defecte causant de la major part de les manifestacions fenotípiques es troba en la disminució del transport de glucosa a través de la barrera hematoencefàlica, i el causen mutacions d'herència autosòmica dominant (molt infreqüents) o de presentació esporàdica (la majoria d'elles) al gen *SLC2A1*. La troballa clau pel diagnòstic és el descens de la concentració de glucosa en LCR, amb valors normals o baixos de lactat en absència d'hipoglucèmia. Els aspectes clínics corresponen a manifestacions neurològiques que s'agrupen en tres dominis: epilèpsia, trastorns del moviment i discapacitat intel·lectual o trastorns de la conducta. El fenotip clàssic suposa una encefalopatia del desenvolupament que inclou els tres dominis esmentats, tot i que hi ha formes moderades i lleus que presenten signes clínics parcials.

La clínica de la pacient va suggerir inicialment sospita de malaltia mitocondrial, ja que presentava afectació cerebel·losa més epilèpsia, en presència d'augment en sang dels valors de lactat i de l'aminoàcid alanina, biomarcadors de malaltia mitocondrial. A més a més, es va poder demostrar la deficiència de CoQ₁₀ tan en múscul com en fibroblasts i en diferents condicions de creixement, evidenciant la implicació del defecte del CoQ₁₀ en el fenotip clínic d'aquesta pacient en particular. Vist que la epilèpsia no es resolia pel tractament amb CoQ₁₀, es va realitzar una punció lumbar en la que es va manifestar un descens clar del valor de glucosa, que

finalment ens va dirigir a trobar una mutació en el gen *SLC2A1*, confirmant el diagnòstic de G1DS.

Marín-Valencia i col·laboradors varen demostrar una reducció generalitzada de la síntesi lipídica cerebral en models murins de G1DS (Marín-Valencia et al., 2012), la qual cosa podria contribuir a la deficiència secundària de CoQ₁₀. Tanmateix, la confirmació del diagnòstic de G1DS, la reducció moderada de CoQ₁₀ en múscul i els posteriors experiments en fibroblasts, on l'enriquiment del medi de cultiu de fibroblasts amb galactosa restaura els nivells del CoQ₁₀, denoten que una disminució de la captació de glucosa pot estar afectant col·lateralment a la via de síntesi del CoQ₁₀ per menys disponibilitat d'acetyl-CoA.

No obstant això, Barca i col·laboradors (Barca et al., 2015) han estudiat recentment una cohort de 16 pacients amb G1DS així com un model murí de la malaltia, amb uns resultats que no reforcen el nostre estudi. En els pacients valorats, l'anàlisi de CoQ₁₀ en plasma, limfòcits i fibroblasts no mostra diferències respecte els controls. Com que la deficiència de CoQ₁₀ és específica de teixit (Emmanuele et al., 2012), l'anàlisi de models murins és imprescindible, però únicament detecten una lleu reducció del CoQ₁₀ en el cerebel, fenomen possiblement degut a la sensibilitat extrema del cerebel a l'estrès oxidatiu. Segons aquests autors, la deficiència secundària de CoQ₁₀ en la nostra pacient podria ser deguda a altres causes no relacionades amb el defecte en GLUT-1, al contrari del que els nostres resultats indiquen, si bé és cert que no podem descartar una deficiència primària de CoQ₁₀ deguda a mutacions en altres gens que participen en el metabolisme del CoQ₁₀ i que no hem analitzat. Així i tot, aquest fet és poc probable ja que vàrem seqüenciar per SANGER la majoria dels gens coneguts implicats en la síntesi del CoQ₁₀ (*PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ3*, *COQ4*, *COQ5*, *COQ6*, *COQ7*, *ADCK3*, *ADCK4*, *COQ9*, *COQ10A* i *COQ10B*) amb resultats negatius. En qualsevol cas, la nostre pacient presentava un fenotip atàxic de la malaltia, mentre que els casos reportats per Barca i col·laboradors representen el fenotip clàssic d'epilèpsia, igual que el model murí estudiat, que recapitula aquest fenotip epilèptic. No podem refusar, per tant, que el defecte de CoQ₁₀ no estigui present en tots els casos, i que possiblement sigui una troballa més freqüent al fenotip atàxic, on la implicació del cerebel sembla més plausible.

D'altra banda, la millora clínica de la pacient, després d'un període de tractament amb CoQ₁₀, sosté la idea de que el CoQ₁₀ pot haver provocat un efecte modificador de la clínica, almenys en referència a les manifestacions cerebel·loses (Pineda et al., 2010). Una de les presentacions clàssiques en les deficiències de CoQ₁₀ primàries (Laredj et al., 2013; Pineda et al., 2010) és l'afectació cerebel·losa, atès que el cerebel és un òrgan molt sensible a l'estrès oxidatiu i a defectes del metabolisme energètic. El tractament en la G1DS consisteix en una dieta cetogènica ajustable per proveir al cervell d'un substrat energètic alternatiu a la glucosa. És possible que la dieta cetogènica recuperi la síntesi lipídica a nivell central, millorant per tant l'estat del CoQ₁₀. Finalment, s'hauria de tenir en compte la possibilitat de mimetisme que les deficiències de CoQ₁₀ puguin tenir en relació als defectes del GLUT-1. Els fenotips són semblants, i especialment en casos amb predominança d'atàxia i epilèpsia, la recomanació seria fer un diagnòstic diferencial entre ambdues entitats.

2.3. Malalties lisosomals: MPS tipus III (malaltia de SanFilippo)

En el darrer treball d'aquest objectiu vàrem estudiar l'estat del CoQ₁₀ en malalties de dipòsit lisosomal, en concret de la MPS tipus III o malaltia de SanFilippo. La MPS tipus III és una malaltia autosòmica recessiva on algun dels enzims lisosomals encarregats de la degradació de l'heparan sulfat no funciona correctament. Es caracteritza per afectació progressiva del SNC amb dismòrfia i altres manifestacions fenotípiques, si bé en alguns casos no hi ha signes clínics específics, la qual cosa pot alentir el diagnòstic (Neufeld & Muenzer, 2001; de Ruijter et al., 2012).

Partim de la descripció dels primers casos de reducció del CoQ₁₀ plasmàtic en pacients amb MPS, troballa inesperada durant una monitorització bioquímica que vàrem realitzar en un grup de pacients en tractament amb genisteïna (Delgado et al., 2011). Amb la idea de profunditzar en les causes i implicacions d'aquesta disminució del CoQ₁₀, es va avaluar l'estat nutricional d'un grup de pacients amb MPS tipus III, d'una forma més exhaustiva que en el primer treball, en els quals vam observar deficiència combinada de PLP, forma activa de la vitamina B₆, i CoQ₁₀ plasmàtic. La resta de micronutrients (oligoelements, vitamines) van mostrar

resultats normals, i només la vitamina E semblava mostrar una tendència a la disminució dels seus valors.

D'entrada, respecte la deficiència de CoQ₁₀, descartaríem una alteració de la biosíntesi tan del CoQ₁₀ com del colesterol, perquè els valors de colesterol estan en el rang de la normalitat en aquest pacients i perquè un estudi de Matalonga i col·laboradors demostra que els fibroblasts de pacients de MPS tenen una taxa de biosíntesi de CoQ₁₀ normal (Matalonga et al., 2014). Per altra banda, no es pot descartar completament un problema en l'absorció gastrointestinal, si bé no sembla molt probable ja que la contribució de les fonts dietètiques al valor total del CoQ₁₀ en sang és tan sols d'un 20% (Weber et al., 1997). La explicació més plausible seria un increment en el consum del CoQ₁₀, ja que s'ha postulat un possible paper de les ROS en la patogènesi de la MPS tipus III B (Villani et al., 2009). A més, s'ha observat en fibroblasts de pacients un efecte positiu després de suplementar amb CoQ₁₀ i altres antioxidants (Matalonga et al., 2014), reduint l'acumulació de glicosaminoglicans. Tanmateix, en els nostres pacients, els valors de tocoferol estan lleugerament per sota de la mitja dels controls, i sabem que el CoQ₁₀ participa en el seu manteniment i reciclatge (Navas et al., 2007).

Respecte la deficiència de PLP, les dades bioquímiques revelen una deficiència real. Aquest fet s'explica perquè la reducció de PLP no va acompanyada d'un increment en l'activitat de la fosfatasa alcalina. L'activitat fosfatasa alcalina manté l'equilibri que es necessita per defosforilar el PLP i que aquest pugui passar a través de les membranes cel·lulars; de manera que un increment de la fosfatasa alcalina podria conduir a una deficiència secundària de PLP, fet que no succeeix en aquests pacients. Així doncs, la deficiència de PLP apareix en plasma i el LCR, per tant hipotetitzem que hi hauria un defecte del transport del PLP a través tan de l'intestí com de la barrera hematoencefàlica. Atès que l'heparan sulfat i els vitàmers fosforilats de la B₆ s'uneixen a cations divalents, seria plausible també pensar que per una acumulació d'heparan sulfat, els vitàmers fosforilats de la B₆ s'hi uneixin i quedin segrestats. De fet, aquest mateix mecanisme ocorre en altres malalties, com la hipoprolinèmia tipus II o el defecte d'antiquitina, malalties en les quals s'ha demostrat que les molècules que s'acumulen formen un adducte amb el PLP, fent-lo inactiu (Farrant et al., 2001; Mills et al., 2006).

El PLP és la forma activa de la vitamina B₆ i cofactor de moltes reaccions enzimàtiques, com per exemple la formació de l'àcid 4OH-fenilpirúvic a partir de la tirosina, el qual és un precursor essencial de l'anell benzoquinona del CoQ₁₀ (veure figura 2 de la introducció) (Spinneker et al., 2007). La deficiència de PLP també s'ha associat amb anterioritat a concentracions baixes de CoQ₁₀ (Willis et al., 1999). Els nostres resultats d'associació entre l'estat de deficiència de CoQ₁₀ i PLP en pacients amb MPS tipus III afavoreixen aquestes observacions realitzades per Willis. En qualsevol cas, probablement la deficiència de CoQ₁₀ en les MPS es podria explicar tan per una deficiència secundària d'aquesta molècula, per la manca de precursor, com per l'augment en el seu consum esmentat anteriorment.

Les deficiències primàries o secundàries de PLP poden causar epilèpsies refractàries en el període neonatal i infantil que responen a suplementació amb aquesta vitamina. D'altra banda, una deficiència crònica de CoQ₁₀ podria conduir a un increment de l'estrès oxidatiu, amb possibles implicacions en la neurodegeneració de la MPS. La demostració en fibroblasts de l'efecte beneficiós del CoQ₁₀ sobre l'acumulació de glicosaminoglicans dóna pes a la importància de valorar la utilització del CoQ₁₀ com a teràpia en aquests pacients. En resum, ambdós compostos, CoQ₁₀ i PLP, podrien ser utilitzats com a teràpia coadjuvant als tractaments actuals en pacients amb MPS tipus III (inhibició de la generació de substrats o substitució enzimàtica), a la espera de la teràpia gènica, que ja es troba en una fase avançada (Pitrowska et al., 2006).

Les tres publicacions presentades atenyen el segon objectiu mitjançant el plantejament de situacions d'afectació del CoQ₁₀ en tres malalties completament diferents. La molècula de CoQ₁₀ es converteix en un element clau que col·labora en els mecanismes patològics o bé compensatoris de la cèl·lula en condicions no fisiològiques. Malgrat en aquestes situacions la deficiència o alteració és un fenomen secundari, probablement accentuï els símptomes causats pel defecte primari, i molts pacients es poden beneficiar de suplementació amb CoQ₁₀ encara que la resposta no sigui tan dramàtica com en pacients amb defectes primaris (Quinzii et al., 2005).

3. Implementar avenços metodològics pel diagnòstic o seguiment de pacients amb deficiències de CoQ₁₀ i malalties mitocondrials

Tal com s'ha comentat, a través del desenvolupament dels dos primers objectius, els defectes de CoQ₁₀ evidencien una afectació multisistèmica a l'organisme, i quasi qualsevol òrgan podria veure's implicat. Per tant, sembla important ampliar l'anàlisi del CoQ₁₀ al major nombre possible d'espècimens biològics, ja que les deficiències podrien quedar emmascarades si no s'escull i analitza el tipus de mostra adequat.

A nivell metodològic, el diagnòstic de CoQ₁₀ presenta certes limitacions: (i) s'han de realitzar biòpsies invasives per estudiar el contingut de CoQ₁₀ endogen, la qual cosa no està sempre justificada, (ii) les deficiències són específiques de teixit, per tant remarca la necessitat d'estudiar tants teixits com sigui possible si la sospita clínica persisteix, (iii), l'anàlisi del CoQ₁₀ en sang (plasma o sèrum) en la majoria del casos no és informatiu respecte al seu estat als teixits, (iv) la disfunció mitocondrial en moltes malalties associa deficiències secundàries de CoQ₁₀, que no sempre es poden diferenciar de les primàries, ja que el grau de deficiència del CoQ₁₀ no és predictiu de defecte primari o secundari, no s'observa acumulació d'altres metabòlits que puguin orientar millor la etiologia genètica del defecte del CoQ₁₀, i les activitats dels complexos de la CRM dependents de CoQ₁₀ no sempre estan reduïdes com s'esperaria.

Lògicament, amb la empenta del diagnòstic genètic en els últims anys, es podria pensar en l'ús de tecnologies de NGS per tal de cercar la causa molecular prèviament a l'anàlisi de biòpsies (Emma et al., 2016). Per facilitar l'anàlisi de dades genètiques massives és necessari disposar d'una bona caracterització del pacient, incloent la informació clínica, bioquímica, histològica i d'activitats enzimàtiques, si n'hi ha. La estratègia diagnòstica òptima per la deficiència de CoQ₁₀ encara roman en debat (revisat a Yubero et al., 2015), si bé és innegable que la seqüenciació convencional per SANGER, gen a gen, no és practicable avui en dia, i l'aplicació de panells de gens dirigits sembla ser l'aproximació més adequada per un diagnòstic inicial practicable i ràpid. En aquest sentit, hem de donar fermesa i pes a les eines bioquímiques que acoten i delimiten la sospita clínica en un temps reduït, sobretot perquè una identificació ràpida de l'estat de deficiència és crucial

per l'èxit de la teràpia amb CoQ₁₀. Per aquest motiu els avenços metodològics que es presenten en aquesta tesi doctoral són de màxima importància i conformen el tercer objectiu concret: primerament, l'anàlisi del CoQ₁₀ en mostres d'orina i, en últim terme, la estimació del valor del CoQ₁₀ com a biomarcador potencial de massa i volum mitocondrial.

3.1. Anàlisi del CoQ₁₀ en mostres de orina

En principi, tots els teixits i òrgans poden veure's afectats per la disfunció del sistema OXPHOS, encara que s'espera que teixits com el SNC i el múscul esquelètic siguin els més afectats, ja que depenen en major mesura del metabolisme aeròbic per la producció d'ATP. En les malalties mitocondrials en general, les manifestacions renals més freqüents són tubulopaties, que es presenten en contextos d'afectació multisistèmica. Curiosament, algunes de les deficiències de CoQ₁₀ presenten malaltia renal en forma de glomerulopaties (característicament síndrome nefròtic resistent a esteroides), freqüentment de forma aïllada (Diomedi-Camassei et al., 2007; Ashraf et al., 2013; McCarthy et al., 2013). Després del cervell, i en segon lloc, els ronyons tenen una de les taxes de consum d'oxigen per pes sec de teixit més altes (Emma et al., 2016). Tan els túbuls renals com els podòcits glomerulars són molt rics en mitocondris, ja que requereixen d'una demanda metabòlica constant. Per una banda, els túbuls renals duen a terme processos de reabsorció continus i, per l'altra, els podòcits són unes cèl·lules altament especialitzades, components principals de la barrera de filtració glomerular amb múltiples funcions essencials (Jefferson et al., 2011). Als podòcits, una disfunció d'OXPHOS implicarà la generació massiva de ROS i alteracions funcionals i estructurals que resultaran en la disrupció de la barrera de filtratge glomerular, amb la generació de proteïnúria i el desencadenament de lesions escleròtiques glomerulars (Mullet-Deile & Schiffer, 2014; Saleem, 2015).

En principi, les anàlisis de la concentració de CoQ₁₀ poden realitzar-se en teixit renal (Diomedi-Camassei et al., 2007), però ens trobem davant del mateix inconvenient que representa la realització de biòpsies musculars (fins i tot més limitant, ja que la pràctica d'una biòpsia renal és una intervenció molt més agressiva que la biòpsia muscular). Per tant, partint de la observació que defectes primaris de CoQ₁₀ (concretament, *COQ2* (Quinzii et al., 2006), *PDSS2* (López et al.,

2006), *COQ6* (Heeringa et al., 2011), *ADCK4* (Ashraf et al., 2013) i *PDSS1* (Vasta et al., 2012)) causen malaltia glomerular i de que un tractament a temps amb dosis altes de CoQ₁₀ atura la progressió de la malaltia i reverteix les manifestacions clíniques del síndrome nefròtic (Montini et al., 2008), la validació analítica de la determinació de CoQ₁₀ en cèl·lules del sediment urinari podria ser una eina amb un potencial diagnòstic elevat i útil pel seguiment del tractament amb CoQ₁₀.

L'anàlisi del CoQ₁₀ total (entenent total com el sumatori de concentracions de les formes oxidades i reduïdes) per HPLC amb detecció electroquímica és un procediment robust que s'ha mostrat molt útil per la quantificació d'aquesta molècula en sang, múscul, fibroblasts, i altres espècimens (Montero et al., 2008). Per mitjà d'aquest procediment, hem establert un rang de referència de la concentració de CoQ₁₀ relacionada amb el contingut de cèl·lules de la orina (estimada per la quantificació de les proteïnes totals) en una població pediàtrica control, amb la intenció d'avaluar, en una segona fase, un conjunt de pacients amb síndrome nefròtic. La valoració de l'estat del CoQ₁₀ en pacients nefrològics permetrà detectar, en primer lloc, deficiències primàries o secundàries de CoQ₁₀ en malalties renals comuns i, en segon lloc, la monitorització del CoQ₁₀ en pacients mitocondrials amb suplementació de CoQ₁₀.

Prèviament a l'establiment dels valors normals, vàrem fer una validació exhaustiva del procediment, ja que hi havia diverses fonts d'incertesa que s'havien de tenir en consideració. En primer lloc, hi ha certs aspectes premetrològics específics de la determinació del CoQ₁₀ en orina que no estan presents quan fem la determinació d'aquest en plasma o teixits. Vàrem demostrar que la recollida i maneig de la mostra és un aspecte crític i únicament les mostres d'orina amb una concentració mínima de cèl·lules (valorada per la concentració total de proteïna) són útils per l'estudi. A part, hi ha variacions molt importants del contingut cel·lular del sediment urinari interindividuals i intraindividuals, essent la orina de primera hora del matí la que presenta menys fluctuació del contingut proteic i, per tant, la més adequada per assegurar una determinació de CoQ₁₀ més fiable. També, és indispensable rentar les cèl·lules amb sèrum fisiològic, per tal d'eliminar les proteïnes que de forma fisiològica apareixen a la orina degut als mecanismes de filtració glomerular i reabsorció tubular i que interfereixen en la quantificació final, esbiaixant la valoració final del CoQ₁₀. Pel que fa als aspectes metrològics

(sensibilitat, imprecisió i linealitat), el procediment va denotar qualitats molt robustes, com ja s'havia demostrat en altres espècimens biològics (Montero et al., 2008).

En definitiva, la determinació del CoQ₁₀ a les cèl·lules del sediment urinari aporta una nova eina per l'estudi de les malalties mitocondrials i dels defectes del CoQ₁₀. Serà interessant comprovar si pacients amb mutacions al mtDNA en aquestes cèl·lules també mostren deficiències de CoQ₁₀ associades, tenint en compte que l'anàlisi del mtDNA procedent de cèl·lules del sediment urinari és una pràctica habitual en l'estudi de les malalties mitocondrials (O'callaghan et al., 2015). Al mateix temps, serà interessant examinar si en situacions de síndrome nefròtic o de tubulopatia, d'etiologia coneguda o desconeguda, els valors de CoQ₁₀ són diferents als observats en població control sana.

3.2. Desenvolupament i aplicació d'un algoritme matemàtic per la interpretació dels valors del CoQ₁₀, CS i activitats de la CRM

En general, les malalties mitocondrials representen un repte pel diagnòstic no només per la participació del mtDNA com a possible causant de la etiologia, sinó per l'immens nombre de proteïnes nuclears que participen en el funcionament mitocondrial, moltes d'elles amb funcions biològiques caracteritzades només parcialment. Els criteris diagnòstics que s'utilitzen en la pràctica clínica agrupen les dades clíniques, radiològiques, bioquímiques i histològiques (Morava et al., 2006; Bernier et al., 2002) classificant els casos en tres graus de probabilitat (diagnòstic definitiu, possible i probable). Tot i que tal nivell de complexitat es comença a resoldre gràcies a la tecnologia NGS pel diagnòstic genètic, posar en pràctica aquestes eines i, sobretot, interpretar les dades obtingudes probablement requereix altres formes de valorar i avaluar els paràmetres bioquímics en pacients mitocondrials. En aquest sentit, i aprofitant la experiència de més de 10 anys en l'estudi de biòpsies musculars, l'últim resultat d'aquest objectiu es basa en la intenció d'explorar el valor del CoQ₁₀ com a nou biomarcador d'activitat mitocondrial.

Encara que la CS és un enzim de la matriu mitocondrial que s'utilitza com a índex de massa mitocondrial (Reisch & Elpeleg, 2007), la seva forta associació amb el CoQ₁₀ ha estat ignorada, tot i que ha estat descrita prèviament per Miles i

col·laboradors (Miles et al., 2008) i també pel nostre grup en pacients amb depleció del mtDNA (Montero et al., 2013). Partint de l'estudi d'una cohort de més de 400 biòpsies de múscul, vàrem detectar –per procediments estadístics convencionals (prova de Pearson)– una correlació molt forta entre el valor del CoQ₁₀ i l'activitat CS. És més, la valoració d'aquestes dues variables respecte la resta d'activitats dels enzims de la CRM indica correlacions més potents del CoQ₁₀ amb els diferents components de la CRM que no pas de la CS. Prèviament ja s'havia suggerit que el contingut total de CoQ₁₀ muscular seria el millor predictor d'alteració de la CRM (Miles et al., 2005). Una limitació dels mètodes de mesura del CoQ₁₀ és que no és possible discernir entre el CoQ₁₀ mitocondrial i el que es troba en altres compartiments cel·lulars, ja que quantifiquem el contingut total de CoQ₁₀. A la pràctica, els valors de CoQ₁₀ i de les activitats dels enzims de la CRM s'expressen tan per gram de proteïna tissular com per unitats d'activitat CS, gràcies al fet que normalitzar per CS permet identificar defectes encoberts per mecanismes compensatoris de proliferació mitocondrial, mentre que la normalització per proteïnes totals ajuda a descobrir defectes de la CRM que s'associen amb activitats CS baixes (Spinazzi et al., 2011; Sarzi et al., 2007; Tesarova et al., 2004). Hem desenvolupat un algorisme matemàtic que demostra el potencial del CoQ₁₀ com a marcador d'activitat mitocondrial, així com ho és l'activitat CS.

La hipòtesi que hem desenvolupat rau en que si tenim correlacions tan elevades entre les diferents variables, ens seria de gran utilitat disposar d'una eina estadística que no ens indiqués únicament el grau de correlació (valor r), sinó que fos capaç d'identificar, dins del conjunt total de dades, subpoblacions en les que la correlació entre les diferents variables fos quasi lineal ($r > 0.95$).

Amb això, vàrem aplicar un procediment divisiu, que consisteix en, partint del total de dades, anar eliminant les dades amb una correlació baixa fins identificar la població que compleixi un valor de $r > 0.95$. L'avantatge d'aquesta aproximació és que ofereix una única solució possible. En consonància, vam aplicar també un procediment aglomeratiu més complex, en el qual partint d'un conjunt de mostres limitat es van afegint noves dades que mantenen una correlació de $r > 0.95$. El procediment aglomeratiu ens proporcionava diferents solucions possibles – identificació de 3 clústers lineals. Tanmateix, la població més nombrosa que havia

estat identificada amb el mètode aglomeratiu presentava una coincidència al voltant del 100% dels casos en ser comparada amb el mètode divisiu, la qual cosa donava validesa al procediment aglomeratiu..

És important destacar que el nombre de pacients que presentaven una correlació $r > 0.95$ era clarament superior (en la majoria dels casos, excepte pel CIII) en el cas del CoQ₁₀ en relació a les activitats dels enzims de la CRM, que no pas quan s'utilitzava l'activitat CS com a marcador. Per tant, demostrem que el valor de CoQ₁₀ presenta una correlació més forta amb els diferents components de la CRM (especialment per l'activitat CII+III) i un major nombre de pacients on aquesta correlació és superior a 0.95. La següent fase serà aplicar aquest algoritme per l'estudi d'altres variables biològiques en diferents sistemes, o també aplicar-lo com a eina predictiva de l'estat diagnòstic dels pacients mitocondrials segons el criteris diagnòstics actuals de probable, possible i definitiu.

Des d'un punt de vista biològic, el resultat d'aquest estudi es poden interpretar de diferents maneres. Si ens traslладem a la cadena respiratòria, en el model plàstic proposat per Acín-Pérez i col·laboradors (Acín-Pérez et al., 2008), l'organització supramolecular de la CRM consistiria en una xarxa d'associacions en SCs així com de complexes individuals. S'ha demostrat tant que els SCs són entitats funcionals com que aquesta estructuració dels complexes implica un avantatge cinètic pel transport electrònic (Genova & Lenaz, 2014). Segons les investigacions realitzades fins ara, existeix una compartimentalització del CoQ₁₀ a la MMI. Per una banda, el CI es troba quasi en la seva totalitat associat amb el CIII formant un SC, que canalitza els electrons mitjançant el CoQ₁₀ ancorat en la unió entre els dos complexes, mentre que per altra banda, la fracció lliure de CoQ₁₀ és necessària per la transferència d'electrons del complex II al complex III lliures a la MMI. Per tant, existeix una fracció mòbil, però també una porció del CoQ₁₀ forma part d'aquesta organització supramolecular, en consonància amb els estudis de Benard i col·laboradors (Benard et al., 2008), que descriuen en rosegadors la existència de tres fraccions diferents de CoQ₁₀.

Segons les nostres observacions, hi ha major correlació del CoQ₁₀ amb els diferents enzims de la CRM, en concordança amb la idea que el CoQ₁₀ es troba compartimentalitzat segons l'estructuració supramolecular de la CRM, donant suport a la hipòtesi que el CoQ₁₀ representa un marcador d'activitat mitocondrial

més fidedigne que no pas la CS. Hem observat que la CS presenta més correlació amb els complexos III i IV, cosa que podria ser explicada perquè aquests dos complexos es troben de forma lliure en proporcions més elevades, en especial el complex IV (Bianchi et al., 2004).

Estudis recents indiquen que les organitzacions dels supercomplexos estableixen un patró dinàmic de control metabòlic i regulació de vies de senyalització (Quarato et al., 2011; Kaambre et al., 2012; Kaambre et al., 2013), amb conseqüències més enllà del control de la CRM. La proposta d'un mecanisme d'adaptació nou sota el control mitocondrial obre un camp prometedori, vista la implicació de la fisiologia mitocondrial en la iniciació i progressió de tantes malalties diferents (Genova et al., 2014).

Així doncs, proposem que la evaluació rutinària del CoQ₁₀ muscular podria ser una nova eina tan per estimar l'activitat mitocondrial com per diagnosticar estats de deficiència (Miles et al., 2005; Miles et al., 2008). Per tant, una reclassificació dels pacients segons els valors de CoQ₁₀ podria conduir a aproximacions diagnòstiques noves. En un constant intent de millorar la estratègia diagnòstica, hem aportat dues vies metodològiques que donen peu a avenços diagnòstics a través d'eines d'accés ràpid i assequible.

4. Perspectives diagnòstiques

Com a cloenda dels treballs presentats, oferim i fomentem les possibilitats tècniques que hi ha al nostre abast per tal de definir i millorar les vies de diagnòstic disponibles. Fins fa res, l'algoritme diagnòstic per l'estudi de les deficiències de CoQ₁₀ ha proporcionat una taxa diagnòstica reduïda, bàsicament per la immensa complexitat del funcionament mitocondrial, en el qual intervenen dos sistemes genètics (el nuclear i el mitocondrial) i hi participen més de 1000 proteïnes com a dianes potencials de desestructuració del sistema OXPHOS.

No només a través dels criteris clínics de classificació, essencials per la orientació diagnòstica dels pacients, sinó a través de la màxima informació bioquímica, genètica i funcional, serem capaços d'avançar cap a procediments diagnòstics més efectius. És evident que el paper de la NGS serà fonamental pel progrés del diagnòstic de les malalties mitocondrials degudes a mutacions en gens nuclears (Wong, 2013; McCarthy et al., 2013), perquè no sempre és possible confirmar bioquímicament i enzimàticament els defectes mitocondrials (DaRe et al., 2013). En aquest sentit, la implementació de la tecnologia de seqüenciació massiva al nostre laboratori empenjarà aquesta part, indispensable de cara a les famílies per oferir un diagnòstic prenatal, si s'escau.

Com a reflexió general plasmada en forma de protocol diagnòstic (Figura 1 de l'annex, pàgina 181), hem actualitzat l'algoritme diagnòstic de les deficiències de CoQ₁₀, tenint en compte els defectes primaris i secundaris així com el tipus d'espècimen utilitzat pel diagnòstic bioquímic inicial. Finalment, les vies obertes a partir dels resultats d'aquesta tesi, pel que fa a l'anàlisi del CoQ₁₀ en mostres biològiques i la utilització dels valors del CoQ₁₀ com a nucli interpretatiu per canviar la visió diagnòstica del grup de les malalties mitocondrials, seran de gran ajuda per millorar el procés diagnòstic i la monitorització de tractaments.

CONCLUSIONS

1. En l'estudi de la cohort de 74 pacients amb diagnòstic etiològic definitiu, hem demostrat que les deficiències secundàries de CoQ₁₀ són més freqüents que les primàries, i apareixen en igual proporció tan en malalties mitocondrials com en no mitocondrials. Hem identificat, a més a més, noves causes de deficiència secundària de CoQ₁₀.

2. En dos pacients amb deficiència de PDH i amb un fenotip molt sever, l'alteració de l'estat del CoQ₁₀, descrita per primera vegada, s'associa a mecanismes compensatoris de proliferació mitocondrial, que finalment causen un desequilibri en la funció mitocondrial.

3. Hem establert com a nova causa secundària de deficiència de CoQ₁₀ el defecte del transportador de glucosa cerebral GLUT-1, aportant dades clíniques, bioquímiques i moleculars que suporten aquesta relació. No obstant, sembla que la deficiència de CoQ₁₀ no seria una troballa unànime a la deficiència de GLUT-1 i probablement estaria relacionada amb el fenotip d'atàxia.

4. La deficiència de CoQ₁₀ plasmàtica s'associa amb una deficiència de PLP en pacients amb MPS tipus III, essent un descobriment quasi universal en aquesta malaltia. Encara que els mecanismes que explicarien aquestes deficiències no s'han establert, s'obre una nova possibilitat terapèutica per les MPS, a l'espera del desenvolupament de la teràpia gènica.

5. La determinació del contingut CoQ₁₀ en orina implica uns aspectes tècnics, principalment premetrològics, que haurien de ser curosament observats per la obtenció de resultats reproduïbles. Aquesta anàlisi permetrà millorar les expectatives diagnòstiques i de monitorització de les deficiències de CoQ₁₀ en pacients mitocondrials i amb malalties renals.

6. Hem desenvolupat i aplicat un algoritme matemàtic per una interpretació diferent de les dades bioquímiques en malalties mitocondrials, que podria, a més, ser útil per l'aplicació en altres tipus de dades biològiques. Com a resultat de la utilització d'aquest algoritme, demostrem que el CoQ₁₀ guarda el potencial de ser una nova eina diagnòstica per reavaluar el diagnòstic de pacients mitocondrials, ja

que tindria un valor inclús superior a l'activitat CS com a biomarcador d'activitat mitocondrial.

BIBLIOGRAFIA

- A** Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32(4):529–539
- Aeby A, Sznajer Y, Cavé H, Rebuffat E, Van Coster R, Rigal O, Van Bogaert P. (2007). Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome associated with muscular coenzyme Q10 deficiency. *J Inherit Metab Dis* 30(5):827
- Ali SA, Faddah L, Abdel-Baky A, Bayoumi A. (2010). Protective effect of L-carnitine and coenzyme Q10 on CCl₄-induced liver injury in rats. *Sci Pharm* 78(4):881–896
- Andrich J, Saft C, Gerlach M, Schneider B, Arz A, Kuhn W, Müller T. (2004). Coenzyme Q10 serum levels in Huntington's disease. *J Neural Transm Suppl* (68):111–116
- Artuch R, Vilaseca MA, Moreno J, Lambruschini N, Cambra FJ, Campistol J. (1999). Decreased serum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 70(5):892–895
- Artuch R, Vilaseca MA, Lambruschini N, Campistol J. (2003). Coenzyme-Q(10) concentration in human phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 26(8):821–823
- Artuch R, Aracil A, Mas A, Monrós E, Vilaseca MA, Pineda M. (2004). Cerebrospinal fluid concentrations of idebenone in Friedreich ataxia patients. *Neuropediatrics* 35(2):95–98
- Artuch R, Brea-Calvo G, Briones P, et al. (2006). Cerebellar ataxia with coenzyme Q(10) deficiency: diagnosis and follow-up after coenzyme Q(10) supplementation. *J Neurol Sci* 246:153–158
- Ashraf S, Gee HY, Woerner S, Xie LX, Vega-Warner V, Lovric S, Fang H, Song X, Cattran DC, Avila-Casado C, Paterson AD, Nitschké P, Bole-Feysot C, Cochat P, Esteve-Rudd J, Haberberger B, Allen SJ, Zhou W, Airik R, Otto EA, Barua M, Al-Hamed MH, Kari JA, Evans J, Bierzynska A, Saleem MA, Böckenhauer D, Kleta R, El Desoky S, Hacıhamdioglu DO, Gok F, Washburn J, Wiggins RC, Choi M, Lifton RP, Levy S, Han Z, Salviati L, Prokisch H, Williams DS, Pollak M, Clarke CF, Pei Y, Antignac C, Hildebrandt F. (2013). ADCK4 mutations promote steroid-resistant

nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest* 123:5179–5189

- B** Balreira A, Boczonadi V, Barca E, Pyle A, Bansagi B, Appleton M, Graham C, Hargreaves IP, Rasic VM, Lochmüller H, Griffin H, Taylor RW, Naini A, Chinnery PF, Hirano M, Quinzii CM, Horvath R. (2014). ANO10 mutations cause ataxia and coenzyme Q₁₀ deficiency. *J Neurol* 261(11):2192–2198

Barca E, Tang M, Kleiner G, Engelstad K, DiMauro S, Quinzii CM, De Vivo DC. (2015). CoQ10 Deficiency Is Not a Common Finding in GLUT1 Deficiency Syndrome. *JIMD Rep* [Epub ahead of print]

Barros MH, Johnson A, Gin P, Marbois BN, Clarke CF, Tzagoloff A. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *J Biol Chem* 280(52):42627–42635

Baruteau J, Hargreaves I, Krywawych S, Chalasani A, Land JM, Davison JE, Kwok MK, Christov G, Karimova A, Ashworth M, Anderson G, Prunty H, Rahman S, Grünewald S. (2014). Successful reversal of propionic acidaemia associated cardiomyopathy: evidence for low myocardial coenzyme Q10 status and secondary mitochondrial dysfunction as an underlying pathophysiological mechanism. *Mitochondrion* 17:150–6

Benard G, Faustin B, Galinier A, Rocher C, Bellance N, Smolkova K, Casteilla L, Rossignol R, Letellier T. (2008). Functional dynamic compartmentalization of respiratory chain intermediate substrates: implications for the control of energy production and mitochondrial diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 40(8):1543–1554

Bentinger M, Brismar K, Dallner G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 7 Suppl:S41–50

Bentinger M, Tekle M, Brismar K, Chojnacki T, Swiezewska E, Dallner G. (2008). Polyisoprenoid epoxides stimulate the biosynthesis of coenzyme Q and inhibit cholesterol synthesis. *J Biol Chem* 283(21):14645–14653

Bentinger M, Tekle M, Dallner G. (2010). Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun* 396(1):74–79

Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, Kaplan RE, Gambardella A, Steinlein OK, Grinton BE, Dean JT, Bordo L, Hodgson BL, Yamamoto T, Mulley JC, Zara F, Scheffer IE. (2004). Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Ann Neurol* 55(4):550–557

Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. (2002). Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 59(9):1406–1411

Bianchi C, Genova ML, Parenti Castelli G, Lenaz G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* 279:36562–36569

Bianchi GP, Fiorella PL, Bargossi AM, Grossi G, Marchesini G. (1994). Reduced ubiquinone plasma levels in patients with liver cirrhosis and in chronic alcoholics. *Liver* 14(3):138–140

Biesecker LG & Green RC. (2014). Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N Engl J Med* 370(25):2418–2425

Blumkin L, Leshinsky-Silver E, Zerem A, Yosovich K, Lerman-Sagie T, Lev D. (2014). Heterozygous Mutations in the ADCK3 Gene in Siblings with Cerebellar Atrophy and Extreme Phenotypic Variability. *JIMD Rep* 12:103–107

Brea-Calvo G, Haack TB, Karall D, Ohtake A, Invernizzi F, Carrozzo R, Kremer L, Dusi S, Fauth C, Scholl-Bürgi S, Graf E, Ahting U, Resta N, Laforgia N, Verrigni D, Okazaki Y, Kohda M, Martinelli D, Freisinger P, Strom TM, Meitinger T, Lamperti C, Lacson A, Navas P, Mayr JA, Bertini E, Murayama K, Zeviani M, Prokisch H, Ghezzi D. (2015). COQ4 mutations cause a broad spectrum of mitochondrial disorders associated with CoQ10 deficiency. *Am J Hum Genet* 96:309–317

Buján N, Arias A, Montero R, García-Villoria J, Lissens W, Seneca S, Espinós C, Navas P, De Meirleir L, Artuch R, Briones P, Ribes A. (2014). Characterization of CoQ10

biosynthesis in fibroblasts of patients with primary and secondary CoQ10 deficiency. *J Inherit Metab Dis* 37:53–62

C Chai W, Cooney RV, Franke AA, Shvetsov YB, Caberto CP, Wilkens LR, Le Marchand L, Henderson BE, Kolonel LN, Goodman MT. (2010). Plasma coenzyme Q10 levels and postmenopausal breast cancer risk: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19(9):2351–2356

Cooney RV, Dai Q, Gao YT, Chow WH, Franke AA, Shu XO, Li H, Ji B, Cai Q, Chai W, Zheng W. (2011). Low plasma coenzyme Q(10) levels and breast cancer risk in Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20(6):1124–1130

Cooper JM, Korlipara LV, Hart PE, Bradley JL, Schapira AH. (2008). Coenzyme Q10 and vitamin E deficiency in Friedreich's ataxia: predictor of efficacy of vitamin E and coenzyme Q10 therapy. *Eur J Neurol* 15(12):1371–1379

Cordero MD, Alcocer-Gómez E, de Miguel M, Cano-García FJ, Luque CM, Fernández-Riejo P, Fernández AM, Sánchez-Alcazar JA. (2011). Coenzyme Q(10): a novel therapeutic approach for Fibromyalgia? case series with 5 patients. *Mitochondrion* 11(4):623–625

Cotan D, Cordero MD, Garrido-Maraver J, Oropesa-Avila M, Rodriguez-Hernandez A, Gómez Izquierdo L, De la Mata M, De Miguel M, Lorite JB, Infante ER, Jackson S, Navas P, Sánchez-Alcázar JA. (2011). Secondary coenzyme Q10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB J* 25:2669–2687

Crane FL, Navas P. (1997). The diversity of coenzyme Q function. *Mol Aspects Med* 18 Suppl:S1–6

Crane FL, Hatefi Y, Lester RL, Widmer C. (1957). Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 25:220–221

Crane FL. (2007). Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion* 7 Suppl:S2–7

D DaRe JT, Vasta V, Penn J, Tran NT, Hahn SH. (2013). Targeted exome sequencing for mitochondrial disorders reveals high genetic heterogeneity. *BMC Med Genet* 14:118

Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S, Tsuji S. (2001). Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* 29:184–188

de Ruijter J, de Ru MH, Wagemans T, Ijlst L, Lund AM, Orchard PJ, Schaefer GB, Wijburg FA, van Vlies N. (2012). Heparan sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides are sensitive markers for newborn screening for mucopolysaccharidoses types I, II and III. *Mol Genet Metab* 107:705–710

Delgadillo V, O'Callaghan Mdel M, Artuch R, Montero R, Pineda M. (2011). Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J Inherit Metab Dis* 34(5):1039–1044

Desbats MA, Lunardi G, Doimo M, Trevisson E, Salviati L. (2015). Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ 10) deficiency. *J Inherit Metab Dis* 38:145–156

Desbats MA, Vetro A, Limongelli I, Lunardi G, Casarin A, Doimo M, Spinazzi M, Angelini C, Cenacchi G, Burlina A, Rodriguez Hernandez MA, Chiandetti L, Clementi M, Trevisson E, Navas P, Zuffardi O, Salviati L. (2015). Primary coenzyme Q10 deficiency presenting as fatal neonatal multiorgan failure. *Eur J Hum Genet* 23(9):1254–1258

Dhanasekaran M & Ren J. (2005). The emerging role of coenzyme Q-10 in aging, neurodegeneration, cardiovascular disease, cancer and diabetes mellitus. *Curr Neurovasc Res* 2(5):447–459

Diomedi-Camassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM, Cardi G, Piemonte F, Montini G, Ghiggeri GM, Murer L, Barisoni L, Pastore A, Muda AO, Valente ML, Bertini E, Emma F. (2007). COQ2 nephropathy: a newly described inherited

mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 18: 2773–2780

Doimo M, Trevisson E, Airik R, Bergdoll M, Santos-Ocaña C, Hildebrandt F, Navas P, Pierrel F, Salviati L. (2014). Effect of vanillic acid on COQ6 mutants identified in patients with coenzyme Q10 deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1842(1):1–6

Doimo M, Desbats MA, Cerqua C, Cassina M, Trevisson E, Salviati L. (2014). Genetics of Coenzyme Q10 deficiency. *Mol Syndromol* 5:156–162

Duberley KE, Hargreaves IP, Chaiwatanasirikul KA, Heales SJ, Land JM, Rahman S, Mills K, Eaton S. (2013). Coenzyme Q10 quantification in muscle, fibroblasts and cerebrospinal fluid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a novel deuterated internal standard. *Rapid Commun Mass Spectrom* 27(9):924–930

Duncan AJ, Heales SJ, Mills K, Eaton S, Land JM, Hargreaves IP. (2005). Determination of coenzyme Q10 status in blood mononuclear cells, skeletal muscle and plasma by HPLC with di-propoxy-coenzyme Q10 as an internal standard. *Clin Chem* 51:2380–2382

Duncan AJ, Bitner-Glindzicz M, Meunier B, Costello H, Hargreaves IP, López LC, Hirano M, Quinzii CM, Sadowski MI, Hardy J, Singleton A, Clayton PT, Rahman S. (2009). A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 84(5):558–566

Duran C & Hartzell HC. (2011). Physiological roles and diseases of Tmem16/Anoctamin proteins: are they all chloride channels? *Acta Pharmacol Sin* 32(6):685–92

E Echtay KS, Winkler E, Klingenberg M. (2000). Coenzyme Q10 is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408:609–613

Elmberger PG, Kalen A, Appelkvist EL, Dallner G. (1987). In vitro and in vivo synthesis of dolichol and other main mevalonate products in various organs of the rat. *Eur J Biochem* 168(1):1–11

Emma F, Montini G, Parikh SM, Salviati L. (2016). Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. doi: 10.1038/nrneph.2015.214. [Epub ahead of print]

Emmanuele V, López LC, Berardo A, Naini A, Tadesse S, Wen B, D'Agostino E, Solomon M, DiMauro S, Quinzii C, Hirano M. (2012). Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review. *Arch Neurol* 69:978–983

Ernster L & Dallner G. (1995). Biochemical, physiological, and Medical aspects of ubiquinone function. *Biochem Biophys Acta* 1271:195–204

F Farrant RD, Walker V, Mills GA, Mellor JM, Langley GJ. (2001). Pyridoxal phosphate de-activation by pyrroline-5-carboxylic acid. Increased risk of vitamin B6 deficiency and seizures in hyperprolinemia type II. *J Biol Chem* 276(18):15107–15116

Folkers K. (1969). Survey on the vitamin aspects of coenzyme Q. *Int Z Vitaminforsch* 39(3):334–352

Folkers K, Osterborg A, Nylander M, Morita M, Mellstedt H. (1997). Activities of vitamin Q10 in animal models and a serious deficiency in patients with cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 234(2):296–299

Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. (1998). A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 273(40):25734–25740

Fragaki K, Chausseot A, Benoist JF, Ait-El-Mkadem S, Bannwarth S, Rouzier C, Cochaud C, Paquis-Flucklinger V. (2016). Coenzyme Q10 defects may be associated with a deficiency of Q10-independent mitochondrial respiratory chain complexes. *Biol Res* 49(1):4

Fu R, Yanjanin NM, Bianconi S, Pavan WJ, Porter FD. (2010). Oxidative stress in Niemann-Pick disease, type C. *Mol Genet Metab* 101(2-3):214–218

G Genova ML & Lenaz G. (2011). New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *Biofactors* 37:330–354

Genova ML & Lenaz G. (2014). Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochim Biophys Acta* 1837(4):427–443

Gempel K, Topaloglu H, Talim B, Schneiderat P, Schoser BG, Hans VH, Pálmafy B, Kale G, Tokatli A, Quinzii C, Hirano M, Naini A, DiMauro S, Prokisch H, Lochmüller H, Horvath R. (2007). The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Brain* 130(Pt 8):2037–2044

Gerards M, van den Bosch B, Calis C, Schoonderwoerd K, van Engelen K, Tijssen M, de Coo R, van der Kooi A, Smeets H. (2010). Nonsense mutations in CABC1/ADCK3 cause progressive cerebellar ataxia and atrophy. *Mitochondrion* 10(5):510–515

Gironi M, Lamperti C, Nemni R, Moggio M, Comi G, Guerini FR, Ferrante P, Canal N, Naini A, Bresolin N, DiMauro S. (2004). Late-onset cerebellar ataxia with hypogonadism and muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 62:818–820

González-Mariscal I, García-Testón E, Padilla S, Martín-Montalvo A, Pomares Viciano T, Vazquez-Fonseca L, Gandolfo Domínguez P, Santos-Ocaña C. (2014). The regulation of coenzyme q biosynthesis in eukaryotic cells: all that yeast can tell us. *Mol Syndromol* 5(3-4):107–118

H Haas D, Niklowitz P, Hoffmann GF, Andler W, Menke T. (2008). Plasma and thrombocyte levels of coenzyme Q10 in children with Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS) and the influence of HMG-CoA reductase inhibitors. *Biofactors* 32(1–4):191–197

Haas D, Niklowitz P, Hörster F, Baumgartner ER, Prasad C, Rodenburg RJ, Hoffmann GF, Menke T, Okun JG. (2009). Coenzyme Q(10) is decreased in fibroblasts of patients with methylmalonic aciduria but not in mevalonic aciduria. *J Inherit Metab Dis* 32(4):570–575

Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, Zhou W, Sloan AJ, Ji Z, Xie LX, Salviati L, Hurd TW, Vega-Warner V, Killen PD, Raphael Y, Ashraf S, Ovunc B, Schoeb DS, McLaughlin HM, Airik R, Vlangos CN, Gbadegesin R, Hinkes B, Saisawat P, Trevisson E, Doimo M, Casarin A, Pertegato V, Giorgi G, Prokisch H, Rötig A, Nürnberg G, Becker C,

Wang S, Ozaltin F, Topaloglu R, Bakkaloglu A, Bakkaloglu SA, Müller D, Beissert A, Mir S, Berdeli A, Varpizen S, Zenker M, Matejas V, Santos-Ocaña C, Navas P, Kusakabe T, Kispert A, Akman S, Soliman NA, Krick S, Mundel P, Reiser J, Nürnberg P, Clarke CF, Wiggins RC, Faul C, Hildebrandt F. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J Clin Invest* 121(5):2013–2024

Heron SE, Crossland KM, Andermann E, Phillips HA, Hall AJ, Bleasel A, Shevell M, Mercho S, Seni MH, Guiot MC, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE. (2002). Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet* 360(9336):851–852

Hoffmann GF, Charpentier C, Mayatepek E, Mancini J, Leichsenring M, Gibson KM, Divry P, Hrebicek M, Lehnert W, Sartor K, Trefz FK, Rating D, Bremer HJ, Nyhan WL. (1993). Clinical and biochemical phenotype in 11 patients with mevalonic aciduria. *Pediatrics* 91(5):915–921

Horvath R, Schneiderat P, Schoser BG, Gempel K, Neuen-Jacob E, Plöger H, Müller-Höcker J, Pongratz DE, Naini A, DiMauro S, Lochmüller H. (2006). Coenzyme Q10 deficiency and isolated myopathy. *Neurology* 66:253–255

Horvath R, Czermin B, Gulati S, Demuth S, Houge G, Pyle A, Dineiger C, Blakely EL, Hassani A, Foley C, Brodhun M, Storm K, Kirschner J, Gorman GS, Lochmüller H, Holinski-Feder E, Taylor RW, Chinnery PF. (2012). Adult-onset cerebellar ataxia due to mutations in CABP1/ADCK3. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83(2):174–178

Horvath R. (2012). Update on clinical aspects and treatment of selected vitamin-responsive disorders II (riboflavin and CoQ 10). *J Inherit Metab Dis* 35(4):679–687

Hübner C, Hoffmann GF, Charpentier C, Gibson KM, Finckh B, Puhl H, Lehr HA, Kohlschütter A. (1993). Decreased plasma ubiquinone-10 concentration in patients with mevalonate kinase deficiency. *Pediatr Res* 34(2):129–133

Hughes K, Lee BL, Feng X, Lee J, Ong CN. (2002). Coenzyme Q10 and differences in coronary heart disease risk in Asian Indians and Chinese. *Free Radic Biol Med* 32(2):132–138

- J** Jakobs BS, van den Heuvel LP, Smeets RJ, de Vries MC, Hien S, Schaible T, Smeitink JA, Wevers RA, Wortmann SB, Rodenburg RJ. (2013). A novel mutation in COQ2 leading to fatal infantile multisystem disease. *J Neurol Sci* 326(1-2):24–28
- Jefferson JA, Alpers CE, Shankland SJ. (2011). Podocyte biology for the bedside. *Am J Kidney Dis* 58(5):835–845
- K** Kaambre T, Chekulayev V, Shevchuk I, Karu-Varikmaa M, Timohhina N, Tepp K, Bogovskaja J, Kütner R, Valvere V, Saks V. (2012). Metabolic control analysis of cellular respiration in situ in intraoperational samples of human breast cancer. *J Bioenerg Biomembr* 44:539–558
- Kaambre T, Chekulayev V, Shevchuk I, Tepp K, Timohhina N, Varikmaa M, Bagur R, Klepinin A, Anmann T, Koit A, Kaldma A, Guzun R, Valvere V, Saks V. (2013). Metabolic control analysis of respiration in human cancer tissue. *Front Physiol* 4:151
- L** Lagier-Tourenne C, Tazir M, López LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, Busso C, Makri S, Ali-Pacha L, Benhassine T, Anheim M, Lynch DR, Thibault C, Plewniak F, Bianchetti L, Tranchant C, Poch O, DiMauro S, Mandel JL, Barros MH, Hirano M, Koenig M. (2008). ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 82(3):661–672
- Lalani SR, Vladutiu GD, Plunkett K, Lotze TE, Adesina AM, Scaglia F. (2005). Isolated mitochondrial myopathy associated with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Arch Neurol* 62(2):317–320
- Lamperti C, Naini A, Hirano M, De Vivo DC, Bertini E, Servidei S, Valeriani M, Lynch D, Banwell B, Berg M, Dubrovsky T, Chiriboga C, Angelini C, Pegoraro E, DiMauro S. (2003). Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 60:1206–1208
- Lapiente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quirós PM, Calvo E, Rodríguez-Hernández MA, Navas P, Cruz R, Carracedo Á, López-Otín C, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P, Fernández-Vizarra E, Enríquez JA. (2013). Supercomplex assembly determines

electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340(6140):1567–1570

Laredj LN, Licitra F, Puccio HM. (2013). The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimie* 100:78–87

Le Ber I, Dubourg O, Benoist JF, Jardel C, Mochel F, Koenig M, Brice A, Lombès A, Dürr A. (2007). Muscle coenzyme Q10 deficiencies in ataxia with oculomotor apraxia 1. *Neurology* 68(4):295–297

Liu YT, Hersheson J, Plagnol V, Fawcett K, Duberley KE, Preza E, Hargreaves IP, Chalasan A, Laurá M, Wood NW, Reilly MM, Houlden H. (2014). Autosomal-recessive cerebellar ataxia caused by a novel ADCK3 mutation that elongates the protein: clinical, genetic and biochemical characterisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85(5):493–498

Logan CV, Szabadkai G, Sharpe JA, Parry DA, Torelli S, Childs AM, Kriek M, Phadke R, Johnson CA, Roberts NY, Bonthron DT, Pysden KA, Whyte T, Munteanu I, Foley AR, Wheway G, Szymanska K, Natarajan S, Abdelhamed ZA, Morgan JE, Roper H, Santen GW, Niks EH, van der Pol WL, Lindhout D, Raffaello A, De Stefani D, den Dunnen JT, Sun Y, Ginjaar I, Sewry CA, Hurles M, Rizzuto R; UK10K Consortium, Duchon MR, Muntoni F, Sheridan E. (2014). Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nat Genet* 46(2):188–193

López LC, Schuelke M, Quinzii C, Kanki T, Rodenburg RJ, Naini A, DiMauro S, Hirano M. (2006). Leigh Syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *The Amer Jour Hum Gen* 79:1125-1129

López LC, Luna-Sánchez M, García-Corzo L, Quinzii CM, Hirano M. (2014). Pathomechanisms in coenzyme q10-deficient human fibroblasts. *Mol Syndromol* 5:163–169

López-Martín JM, Salviati L, Trevisson E, Montini G, DiMauro S, Quinzii C, Hirano M, Rodriguez-Hernandez A, Cordero MD, Sánchez-Alcázar JA, Santos-Ocaña C, Navas

P. (2007). Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis. *Hum Mol Genet* 16:1091–1097

M Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. (2009). Coenzyme Q10 deficiency in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) is related to fatigue, autonomic and neurocognitive symptoms and is another risk factor explaining the early mortality in ME/CFS due to cardiovascular disorder. *Neuro Endocrinol Lett* 30(4):470–476

Marin-Valencia I, Good LB, Ma Q, Duarte J, Bottiglieri T, Sinton CM, Heilig CW, Pascual JM. (2012). Glut1 deficiency (G1D): epilepsy and metabolic dysfunction in a mouse model of the most common human phenotype. *Neurobiol Dis* 48:92–101

Matalonga L, Arias A, Coll MJ, Garcia-Villoria J, Gort L, Ribes A. (2014). Treatment effect of coenzyme Q(10) and an antioxidant cocktail in fibroblasts of patients with Sanfilippo disease. *J Inherit Metab Dis* 37:439–446

Matsuoka T, Maeda H, Goto Y, Nonaka I. (1991). Muscle coenzyme Q10 in mitochondrial encephalomyopathies *Neuromuscul Disord* 1(6):443–447

McCarthy HJ, Bierzynska A, Wherlock M, Ognjanovic M, Kerecuk L, Hegde S, Feather S, Gilbert RD, Krischock L, Jones C, Sinha MD, Webb NJ, Christian M, Williams MM, Marks S, Koziell A, Welsh GI, Saleem MA; RADAR the UK SRNS Study Group. (2013). Simultaneous sequencing of 24 genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 8(4):637–648

Menke T, Niklowitz P, Reinehr T, de Sousa GJ, Andler W. (2004). Plasma levels of coenzyme Q10 in children with hyperthyroidism. *Horm Res* 61(4):153–158

Mignot C, Apartis E, Durr A, Marques Lourenço C, Charles P, Devos D, Moreau C, de Lonlay P, Drouot N, Burglen L, Kempf N, Nourisson E, Chantot-Bastaraud S, Lebre AS, Rio M, Chaix Y, Bieth E, Roze E, Bonnet I, Canaple S, Rastel C, Brice A, Rötig A, Desguerre I, Tranchant C, Koenig M, Anheim M. (2013). Phenotypic variability in ARCA2 and identification of a core ataxic phenotype with slow progression. *Orphanet J Rare Dis* 8:173

Miles L, Miles MV, Tang PH, Horn PS, Quinlan JG, Wong B, Wenisch A, Bove KE. (2005). Ubiquinol: a potential biomarker for tissue energy requirements and oxidative stress. *Clin Chim Acta* 360(1-2):87–96

Miles MV, Horn PS, Tang PH, Morrison JA, Miles L, DeGrauw T, Pesce AJ. (2004). Age-related changes in plasma coenzyme Q10 concentrations and redox state in apparently healthy children and adults. *Clin Chim Acta* 347: 139–144

Miles MV. (2007). The uptake and distribution of coenzyme Q10. *Mitochondrion* 7 Suppl:S72–S77

Miles MV, Miles L, Tang PH, Horn PS, Steele PE, DeGrauw AJ, Wong BL, Bove KE. (2008). Systematic evaluation of muscle coenzyme Q10 content in children with mitochondrial respiratory chain enzyme deficiencies. *Mitochondrion* 8:170–180

Mills PB, Struys E, Jakobs C, Plecko B, Baxter P, Baumgartner M, Willemsen MA, Omran H, Tacke U, Uhlenberg B, Weschke B, Clayton PT. (2006). Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nat Med* 12(3):307–309

Miyamae T, Seki M, Naga T, Uchino S, Asazuma H, Yoshida T, Iizuka Y, Kikuchi M, Imagawa T, Natsumeda Y, Yokota S, Yamamoto Y. (2013). Increased oxidative stress and coenzyme Q10 deficiency in juvenile fibromyalgia: amelioration of hypercholesterolemia and fatigue by ubiquinol-10 supplementation. *Redox Rep* 18(1):12–19

Mollet J, Giurgea I, Schlemmer D, Dallner G, Chretien D, Delahodde A, Bacq D, Lonlay P, Munnich A, Rötig A. (2007). Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *The Jour Clin Invest* 117(3):765–772

Mollet J, Delahodde A, Serre V, Chretien D, Schlemmer D, Lombes A, Boddaert N, Desguerre I, de Lonlay P, de Baulny HO, Munnich A, Rötig A. (2008). CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am J Hum Genet* 82:623–630

Molyneux SL, Florkowski CM, George PM, Pilbrow AP, Frampton CM, Lever M, Richards AM. (2008). Coenzyme Q10: an independent predictor of mortality in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 52(18):1435–1441

Montero R, Artuch R, Briones P, Nascimento A, García-Cazorla A, Vilaseca MA, Sánchez-Alcázar JA, Navas P, Montoya J, Pineda M. (2005). Muscle coenzyme Q10 concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders. *Biofactors* 25:109–115

Montero R, Sánchez-Alcázar JA, Briones P, Hernández AR, Cordero MD, Trevisson E, Salviati L, Pineda M, García-Cazorla A, Navas P, Artuch R. (2008). Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin Biochem* 41:697–700

Montero R, Grazina M, López-Gallardo E, Montoya J, Briones P, Navarro-Sastre A, Land JM, Hargreaves IP, Artuch R Coenzyme Q₁₀ Deficiency Study Group. (2013). Coenzyme Q₁₀ deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion* 13(4):337–341

Montini G, Malaventura C, Salviati L. (2008). Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency. *N Engl J Med* 358(26):2849-2850

Morava E, van den Heuvel L, Hol F, de Vries MC, Hogeveen M, Rodenburg RJ, Smeitink JA. (2006). Mitochondrial disease criteria: diagnostic applications in children. *Neurology* 67(10):1823–1826

Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Mendonca P, Barros J, Coutinho P, Sequeiros J, Koenig M. (2001). Homozygosity mapping of Portuguese and Japanese forms of ataxia-oculomotor apraxia to 9p13, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 68:501–508

Mortensen SA, Heidt P, Sehested J. (1998). Clinical perspectives in treatment of cardiovascular diseases with coenzyme Q 10. In: Highlights in Ubiquinone Research. Lenza G, Barnabei, Rabbi A, Battion M (eds.). Taylor and Francis, London, pp 226–227

Muller-Deile J & Schiffer M. (2014). The podocyte power-plant disaster and its contribution to glomerulopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:209

Multiple-System Atrophy Research Collaboration. (2013). Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 369(3):233–244

Musumeci O, Naini A, Slonim AE, Skavin N, Hadjigeorgiou GL, Krawiecki N, Weissman BM, Tsao CY, Mendell JR, Shanske S, De Vivo DC, Hirano M, DiMauro S. (2001). Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 56(7):849–855

N Navarro-Sastre A, Tort F, Garcia-Villoria J, Pons MR, Nascimento A, Colomer J, Campistol J, Yoldi ME, López-Gallardo E, Montoya J, Unceta M, Martinez MJ, Briones P, Ribes A. (2012). Mitochondrial DNA depletion syndrome: new descriptions and the use of citrate synthase as a helpful tool to better characterise the patients. *Mol Genet Metab* 107(3):409–415

Navas P, Villalba JM, de Cabo R. (2007). The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion* 7 Suppl:S34–40

Neufeld EF & Muenzer J. (2001). The mucopolysaccharidoses. In: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (eds.). 8th edition, Vol III. McGraw-Hill, Medical Publishing Division, pp 3421–3452

Niklowitz P, Menke T, Andler W, Okun JG. (2004). Simultaneous analysis of coenzyme Q10 in plasma, erythrocytes and platelets: comparison of the antioxidant level in blood cells and their environment in healthy children and after oral supplementation in adults. *Clin Chim Acta* 342:219–226

O O'Callaghan MM, Emperador S, Pineda M, López-Gallardo E, Montero R, Yubero D, Jou C, Jimenez-Mallebrera C, Nascimento A, Ferrer I, García-Cazorla A, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Artuch R. (2015). Mutation loads in different tissues from six pathogenic mtDNA point mutations. *Mitochondrion* 22:17–22

Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D. (1989). Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2379–2382

Oudshoorn JH, Lecluse AL, van den Berg R, Vaes WH, van der Laag J, Houwen RH. (2006). Decreased coenzyme Q10 concentration in plasma of children with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43(5):646–650

P Palan PR, Mikhail MS, Shaban DW, Romney SL. (2003). Plasma concentrations of coenzyme Q10 and tocopherols in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Eur J Cancer Prev* 12(4):321–326

Palamakula A, Soliman M, Khan MM. (2005). Regional permeability of coenzyme Q10 in isolated rat gastrointestinal tracts. *Pharmazie* 60 (3):212–214

Pastore A, Di Giovamberadino G, Petrillo S, Boenzi S, Bertini S, Dionisi-Vici C, Piemonte F. (2012). Pediatric reference intervals for muscle coenzyme Q 10. *Biomarkers* 17: 764–766

Pineda M, Montero R, Aracil A, O'Callaghan MM, Mas A, Espinos C, Martinez-Rubio D, Palau F, Navas P, Briones P, Artuch R. (2010). Coenzyme Q(10)-responsive ataxia: 2-year-treatment follow-up. *Mov Disord* 25:1262–1268

Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Barańska S, Tylki-Szymańska A, Czartoryska B, Wegrzyn A, Wegrzyn G. (2006). Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *Eur J Hum Genet* 14(7):846–852

Q Quarato G, Piccoli C, Scrima R, Capitanio N. (2011). Variation of flux control coefficient of cytochrome c oxidase and of the other respiratory chain complexes at different values of protonmotive force occurs by a threshold mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1807:1114–1124

Quinzii CM, Garone C, Emmanuele V, Tadesse S, Krishna S, Dorado B, Hirano M. (2013). Tissue-specific oxidative stress and loss of mitochondria in CoQ-deficient Pdss2 mutant mice. *FASEB J* 27(2):612–621

Quinzii C, Naini A, Salviati L, Trevisson E, Navas P, DiMauro S, Hirano M. (2006). A mutation in para-hydroxybenzoatepolyprenyl transferase (COQ2) causes a primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 78:345–349

Quinzii CM, Kattah AG, Naini A, Akman HO, Mootha VK, DiMauro S, Hirano M. (2005). Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology* 64(3):539–541

Quinzii CM, López LC, Von-Moltke J, Naini A, Krishna S, Schuelke M, Salviati L, Navas P, DiMauro S, Hirano M. (2008). Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J* 22(6):1874–1885

R Rahman S, Hargreaves I, Clayton P, Heales S. (2001). Neonatal presentation of coenzyme Q 10 deficiency. *J Pediatr* 139:456–458

Reisch AS & Elpeleg O. (2007). Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of TCA cycle enzymes and PDHc. *Methods Cell* 80:199–222

Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. (2015). High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell* 58(4):586–597

Rodríguez-Hernández A, Cordero MD, Salviati L, Artuch R, Pineda M, Briones P, Gómez Izquierdo L, Cotán D, Navas P, Sánchez-Alcázar JA. (2009). Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy*. 5(1):19–32

Rötig A, Appelkvist EL, Geromel V, Chretien D, Kadhom N, Edery P, Lebideau M, Dallner G, Munnich A, Ernster L, Rustin P. (2000). Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet* 356(9227):391–395

Rusciani L, Proietti I, Rusciani A, Paradisi A, Sbordoni G, Alfano C, Panunzi S, De Gaetano A, Lippa S. (2006). Low plasma coenzyme Q10 levels as an independent prognostic factor for melanoma progression. *J Am Acad Dermatol* 54(2):234–241

- S** Sacconi S, Trevisson E, Salviati L, Aymé S, Rigal O, Redondo AG, Mancuso M, Siciliano G, Tonin P, Angelini C, Auré K, Lombès A, Desnuelle C. (2010). Coenzyme Q10 is frequently reduced in muscle of patients with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul Disord* 20(1):44–48
- Saleem MA. (2015). One hundred ways to kill a podocyte. *Nephrol Dial Transplant* 30(8):1266–1271
- Salviati L, Trevisson E, Rodriguez Hernandez MA, Casarin A, Pertegato V, Doimo M, Cassina M, Agosto C, Desbats MA, Sartori G, Sacconi S, Memo L, Zuffardi O, Artuch R, Quinzii C, Dimauro S, Hirano M, Santos-Ocaña C, Navas P. (2012). Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *J Med Genet* 49(3):187–191
- Salviati L, Sacconi S, Murer L, Zacchello G, Franceschini L, Laverda AM, Basso G, Quinzii C, Angelini C, Hirano M, Naini AB, Navas P, DiMauro S, Montini G. (2005). Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology* 65:606–608
- Santos-Ocaña C, Do TQ, Padilla S, Navas P, Clarke CF. (2002). Uptake of exogenous coenzyme Q and transport to mitochondria is required for bc1 complex stability in yeast coq mutants. *J Biol Chem* 277(13):10973–10981
- Sarzi E, Bourdon A, Chrétien D, Zarhrate M, Corcos J, Slama A, Cormier-Daire V, de Lonlay P, Munnich A, Rötig A. (2007). Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J Pediatr* 150(5):531–534
- Sastry PS, Jayaraman J, Ramasarma T. (1961). Intracellular distribution of coenzyme Q. *Nature* 189:577–580
- Scalais E, Chafai R, Van Coster R, Bindl L, Nuttin C, Panagiotaraki C, Seneca S, Lissens W, Ribes A, Geers C, Smet J, De Meirleir L. (2013). Early myoclonic epilepsy, hypertrophic cardiomyopathy and subsequently a nephrotic syndrome in a patient with CoQ10 deficiency caused by mutations in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2). *Eur J Paediatr Neurol* 17(6):625–630

Schnekenberg RP & Németh AH. (2014). Next-generation sequencing in childhood disorders. *Arch Dis Child* 99(3):284–290.

Schwarz N, Hahn A, Bast T, Müller S, Löffler H, Maljevic S, Gaily E, Prehl I, Biskup S, Joensuu T, Lehesjoki AE, Neubauer BA, Lerche H, Hedrich UB. (2016). Mutations in the sodium channel gene SCN2A cause neonatal epilepsy with late-onset episodic ataxia. *J Neurol* 263(2):334–343

Shults CW, Haas RH, Passor D, Beal MF. (1997). Coenzyme Q10 is reduced in mitochondria from Parkinsonian patients. *Ann Neurol* 42:261–265

Shults CW, Haas R. (2005). Clinical trials of coenzyme Q10 in neurological disorders. *Biofactors* 25(1-4):117–126

Spiegel R, Saada A, Halvardson J, Soiferman D, Shaag A, Edvardson S, Horovitz Y, Khayat M, Shalev SA, Feuk L, Elpeleg O. (2014). Deleterious mutation in FDX1L gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy. *Eur J Hum Genet* 22(7):902–906

Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Ermani M, Salviati L, Angelini C. (2011). Optimization of respiratory chain enzymatic assays in muscle for the diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 11:893–904

Spinazzola A. (2011). Mitochondrial DNA mutations and depletion in pediatric medicine. *Semin Fetal Neonatal Med* 16(4):190–196

Spinneker A, Sola R, Lemmen V, Castillo MJ, Pietrzik K, González-Gross M. (2007). Vitamin B6 status, deficiency and its consequences—an overview. *Nutr Hosp* 22:7–24

Stryer L. (2004). Chapter 21: Oxidative Phosphorilation. In: *Biochemistry*. 4th Edition. WH Freeman, New York. pp 529–555

T Terracciano A, Renaldo F, Zanni G, D' Amico A, Pastore A, Barresi S, Valente EM, Piemonte F, Tozzi G, Carrozzo R, Valeriani M, Boldrini R, Mercuri E, Santorelli FM, Bertini E. (2012). The use of muscle biopsy in the diagnosis of undefined ataxia with cerebellar atrophy in children. *Eur J Paediatr Neurol* 16:248–256

Tesarova M, Mayr JA, Wenchich L, Hansikova H, Elleder M, Blahova K, Sperl W, Zeman J. (2004). Mitochondrial DNA depletion in Alpers syndrome. *Neuropediatrics* 35(4):217–223

Turunen M, Olson J, Dallner G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 1660:171–199

V Vasta V, Merritt JL 2nd, Saneto RP, Hahn SH. (2012). Next-generation sequencing for mitochondrial diseases: a wide diagnostic spectrum. *Pediatr Int* 54(5):585–601

Villani GR, Di Domenico C, Musella A, Cecere F, Di Napoli D, Di Natale P. (2009). Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res* 1279:99–108

W Watts GF, Playford DA. (1998). Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus: an hypothesis. *Atherosclerosis* 141(1):17–30

Weber C, Bysted A, Holmer G. (1997). Coenzyme Q10 in the diet–daily intake and relative bioavailability. *Mol Aspects Med* 18 Suppl:S251–254

Willis R, Anthony M, Sun L, Honse Y, Qiao G. (1999). Clinical implications of the correlation between coenzyme Q10 and vitamin B6 status. *Biofactors* 9:359–363

Wong LJ. (2013). Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 13:379–387

Y Yavarna T, Al-Dewik N, Al-Mureikhi M, Ali R, Al-Mesaifri F, Mahmoud L, Shahbeck N, Lakhani S, AlMulla M, Nawaz Z, Vitazka P, Alkuraya FS, Ben-Omran T. (2015). High diagnostic yield of clinical exome sequencing in Middle Eastern patients with Mendelian disorders. *Hum Genet* 134(9):967–980.

Yubero D, Montero R, Artuch R, Land JM, Heales SJ, Hargreaves IP. (2014). Biochemical diagnosis of coenzyme q10 deficiency. *Mol Syndromol* 5(3-4):147–155

Yubero D, Montero R, Artuch R. (2015). What can we Expect from Blood (Plasma) Coenzyme Q10 Analysis?. In: Coenzyme Q10: From Fact to Fiction. Hargreaves IP & Hargreaves AK (eds.). Nova Science Publishers, New York.

Yubero D, Montero R, Armstrong J, Espinós C, Palau F, Santos-Ocaña C, Salviati L, Navas P, Artuch R. (2015). Molecular diagnosis of coenzyme Q10 deficiency. *Expert Rev Mol Diagn* 15(8):1049–1059

Z Zierz S, Jahns G, Jerusalem F. (1989). Coenzyme Q in serum and muscle of 5 patients with Kearns-Sayre syndrome and 12 patients with ophthalmoplegia plus. *J Neurol* 236(2):97–101

ANNEX

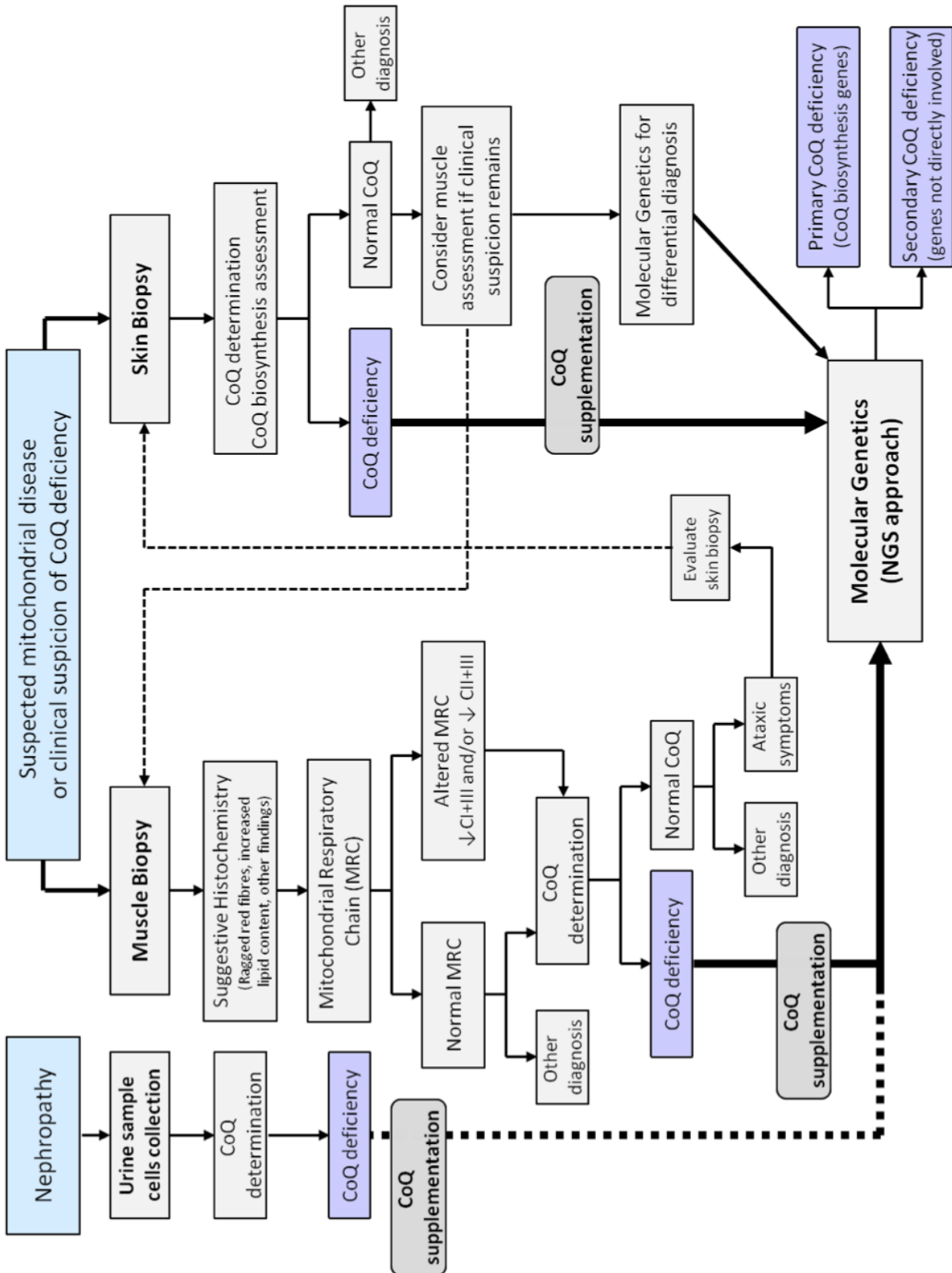


Figura 1. Algoritme diagnòstic de les deficiències de coenzim Q₁₀

ALTRES PUBLICACIONS

Yubero D, Brandi NM, Ormazabal A, Garcia-Cazorla A, Pérez-Dueñas B, Campistol J, Ribes A, Palau F, Artuch R, Armstrong J and *IEM working group*. Targeted next generation sequencing in patients with inborn errors of metabolism. PloS One. (Submitted).

Montero R, **Yubero D**, Villarroya J, Henares D, Jou C, Rodríguez MA, Ramos F, Nascimento A, Ortez CI, Campistol J, Perez-Dueñas B, O'Callaghan M, Pineda M, Garcia-Cazorla A, Oferil JC, Montoya J, Ruiz-Pesini E, Emperador S, Meznaric M, Campderros L, Kalko SG, Villarroya F, Artuch R, Jimenez-Mallebrera C. GDF-15 Is Elevated in Children with Mitochondrial Diseases and Is Induced by Mitochondrial Dysfunction. PLoS One. 2016 Feb 11;11(2):e0148709.

Cassis L, Cortès-Saladelafont E, Molero-Luis M, **Yubero D**, González MJ, Herrero AO, Fons C, Jou C, Sierra C, Castejon Ponce E, Ramos F, Armstrong J, O'Callaghan MM, Casado M, Montero R, Olivas SM, Artuch R, Barić I, Bartoloni F, Bellettato CM, Bonifazi F, Ceci A, Cvitanović-Šojat L, Dali CI, D'Avanzo F, Fumic K, Giannuzzi V, Lampe C, Scarpa M, Cazorla ÁG. Review and evaluation of the methodological quality of the existing guidelines and recommendations for inherited neurometabolic disorders. Orphanet J Rare Dis. 2015 Dec 30;10(1):164.

Catalán-García M, Garrabou G, Morén C, Guitart-Mampel M, Gonzalez-Casacuberta I, Hernando A, Gallego-Escuredo J, **Yubero D**, Villarroya F, Montero R, O-Callaghan AS, Cardellach F, Grau J. BACE-1, PS-1 and sAPP β levels are increased in plasma from sporadic inclusion body myositis patients: surrogate biomarkers among inflammatory myopathies. Mol Med. 2015 Nov 3.

O'Callaghan MM, Emperador S, Pineda M, López-Gallardo E, Montero R, **Yubero D**, Jou C, Jimenez-Mallebrera C, Nascimento A, Ferrer I, García-Cazorla A, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Artuch R. Mutation loads in different tissues from six pathogenic mtDNA point mutations. Mitochondrion. 2015 May;22:17-22.