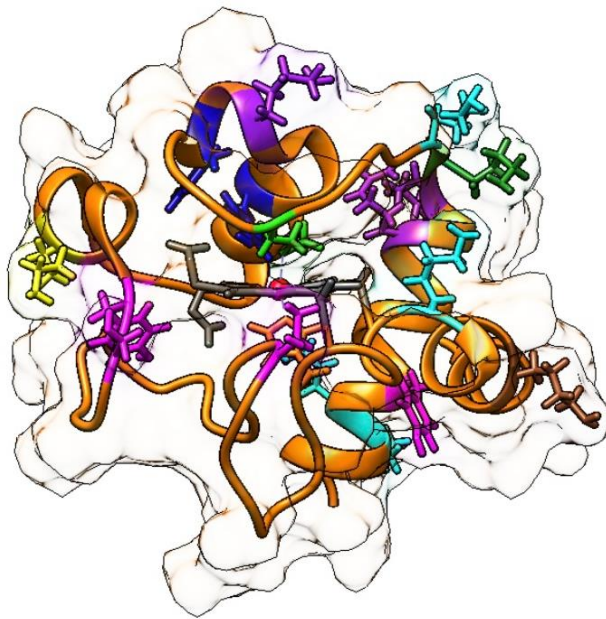




UNIVERSIDAD DE SEVILLA



“Papel del citocromo *c* en la respiración celular y regulación por modificaciones postraduccionales”



TRABAJO FIN DE GRADO

FACULTAD DE BIOLOGÍA

GRADO EN BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA VEGETAL Y BIOLOGÍA

MOLECULAR

Autor: Andrés Conejero Guillén

Tutora: Katuska González Arzola

Convocatoria: Julio, 2023

Imagen en portada: Estructura tridimensional del citocromo *c* humano (PDB: 2N9I). El grupo hemo *c* se representa en gris y con el átomo de hierro en rojo. La apoproteína aparece coloreada en naranja. Se representan las cadenas laterales de los residuos que se han descrito como dianas de modificaciones postraduccionales en mamíferos y que regulan la funcionalidad de la hemoproteína en el metabolismo energético: fosforilación (en magenta), nitración (azul), acetilación (amarillo), glicación (morado), sulfoxidación (verde), homocisteinilación (cian), acetilación/homocisteinilación (marrón) y glicación/homocisteinilación (verde oscuro). Asimismo, se indica en naranja la cadena lateral del residuo His18, implicado en la coordinación axial del grupo hemo *c* junto con el residuo Met80. Imagen realizada en *UCSF Chimera*. PDB: *Protein Data Bank*.

ÍNDICE

Resumen	1
Abreviaturas.....	2
1 Introducción	4
1.1 Concepto de respiración celular y fosforilación oxidativa	4
1.2 Citocromos y grupos hemo	5
1.3 Funciones del citocromo <i>c</i>	5
1.3.1 Transporte de electrones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial	5
1.3.2 Apoptosis	5
1.3.3 Respuesta al daño en el DNA	6
2 Estructura del citocromo <i>c</i>	7
3 Citocromo <i>c</i> en el metabolismo energético	9
3.1 Sitios de unión del citocromo <i>c</i> a los Complejos Mitocondriales III y IV	9
3.2 Mecanismos de transferencia electrónica del citocromo <i>c</i>	10
3.2.1 Según el modelo de plasticidad de organización de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	10
3.2.2 A corta distancia	11
3.2.3 A larga distancia	11
3.3 Papel del citocromo <i>c</i> en la estabilidad estructural de los complejos mitocondriales.....	13
3.4 Papel del citocromo <i>c</i> en la funcionalidad y ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales.....	15
3.5 Papel del citocromo <i>c</i> en la dinámica y funcionalidad mitocondrial	16
4 Regulación del papel del citocromo <i>c</i> en el metabolismo energético por modificaciones postraduccionales	17
4.1 Fosforilación	17
4.2 Nitración	19
4.3 Acetilación	20
4.4 Glicación	21
4.5 Sulfoxidación	22
4.6 Homocisteinilación	22
5 Conclusiones y perspectivas futuras	24
6 Bibliografía.....	25

Resumen

El citocromo *c* es una proteína pequeña y globular cuya función principal consiste en actuar como un transportador electrónico móvil entre los complejos III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Asimismo, se encuentra aparentemente implicado en la estabilidad estructural de los complejos mitocondriales I, III y IV y posiblemente también en la estabilidad estructural de los supercomplejos mitocondriales. El citocromo *c* se considera actualmente una proteína multifuncional de clave importancia para la homeostasis celular, que, además de sus funciones en la fosforilación oxidativa, se encuentra implicada en procesos como la apoptosis y potencialmente en la respuesta al daño en el DNA.

El presente trabajo analizará el papel del citocromo *c* en el metabolismo energético y cómo el mismo se regula mediante diferentes modificaciones postraduccionales, las cuales alteran la funcionalidad de la proteína. Asimismo, se describirán los mecanismos de transferencia electrónica del citocromo *c*.

Palabras clave: cadena de transporte de electrones mitocondrial; cadena respiratoria; catabolismo; citocromo; citocromo *bc*₁; citocromo *c*; citocromo *c* oxidasa; citocromo *c*₁; complejo III; complejo IV; fosforilación oxidativa; grupo hemo; hemo; hemoproteína; metabolismo energético; metabolismo redox; metaloproteína; mitocondria; modificaciones postraduccionales; respiración celular

Abreviaturas

AcM: <i>Acetylated Mutant cytochrome c</i>	eIF2 α : <i>Eukaryotic translation Initiation Factor 2 subunit Alpha</i>
ALDOA: <i>Fructose-bisphosphate Aldolase A</i>	eIF2 γ : <i>Eukaryotic translation Initiation Factor 2 subunit Gamma</i>
AMP: <i>Adenosine Monophosphate</i>	ET: <i>Electron Transfer reaction</i>
ANP32B: <i>Acidic leucine-rich Nuclear Phosphoprotein 32 family member B</i>	ETC: <i>Mitochondrial Electron Transport Chain</i>
APAF-1: <i>Apoptotic Protease-Activating Factor 1</i>	GAPDC1: <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase C subunit 1</i>
ApoCc: <i>Apocytochrome c</i>	GLY2: <i>Glyoxalase II</i>
ATP: <i>Adenosine Triphosphate</i>	HC: <i>Homocysteine</i>
BiP1: <i>Luminal-Binding Protein 1</i>	HCh: <i>Histone Chaperone</i>
β : <i>Distance-Decay Parameter</i>	HEC: <i>C-type Heme group</i>
Cb: <i>Cytochrome b</i>	hnRNP C1/C2: <i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C1 and C2</i>
Cc: <i>Cytochrome c</i>	HSP70: <i>Heat Shock 70 kDa Protein 5</i>
Cc ₁ : <i>Cytochrome c₁</i>	IMM: <i>Inner Mitochondrial Membrane</i>
CI: <i>Complex I</i>	kDa: <i>Kilodalton</i>
CII: <i>Complex II</i>	k _{ET} : <i>Electron Transfer Rate Constant</i>
CIII: <i>Complex III</i>	KO: <i>Knockout Mutant</i>
CIV: <i>Complex IV</i>	MC: <i>Mitochondrial Complex</i>
CL: <i>Cardiolipin</i>	MCM6: <i>Minichromosome Maintenance complex 6</i>
DD: <i>Deoxyribonucleic acid Damage</i>	MG: <i>Methylglyoxal</i>
DNA: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>	MIMS: <i>Mitochondrial Intermembrane Space</i>
$\Delta\Psi_m$: <i>Mitochondrial Membrane Potential</i>	
EC: <i>Electron Carrier</i>	
EF: <i>Electron Flux</i>	

MM: <i>Mitochondrial Matrix</i>	RD21: <i>Cysteine proteinase Responsive to Desiccation-21</i>
MSC: <i>Mitochondrial Supercomplex</i>	ROS: <i>Reactive Oxygen Species</i>
mV: <i>Millivolt</i>	R5P: <i>Ribose 5-Phosphate</i>
NADH: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide (reduced)</i>	RP: <i>Redox Potential</i>
NCL: <i>Nucleolin</i>	SET/TAF-I β : <i>Suppressor of variegation, Enhancer of zeste and Trithorax/Template-Activating Factor-Iβ</i>
NPM: <i>Nucleophosmin</i>	Sm/D1: <i>Small nuclear ribonucleoprotein D1</i>
NRP1: <i>Nucleosome assembly protein 1-Related Protein 1</i>	STRAP: <i>Serine-Threonine kinase Associated Protein</i>
OMM: <i>Outer Mitochondrial Membrane</i>	SYK: <i>Spleen Tyrosine (Y) Kinase</i>
OS: <i>Oxidative Stress</i>	TCL: <i>Transcriptional Coactivator-Like</i>
OXPHOS: <i>Oxidative Phosphorylation</i>	TNF: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
PCD: <i>Programmed Cell Death</i>	UQ: <i>Ubiquinone</i>
pCMF: <i>p-Carboxy-Methyl-L-Phenylalanine</i>	WT: <i>Wild Type</i>
PDB: <i>Protein Data Bank</i>	
PM: <i>Phosphomimetic Mutant cytochrome c</i>	
PTM: <i>Post-Translational Modification</i>	

1 Introducción

1.1 Concepto de respiración celular y fosforilación oxidativa

La respiración celular es el proceso que engloba el conjunto de reacciones bioquímicas que resultan en el consumo de oxígeno molecular por el complejo IV (CIV) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC, de sus siglas en inglés) y que dan lugar a la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) [1]. El ATP es la principal biomolécula utilizada por los organismos vivos como fuente de energía química [2].

La fosforilación oxidativa (OXPHOS) es el proceso que representa la parte final del catabolismo en organismos aeróbicos, y permite la síntesis de ATP empleando la energía obtenida como resultado de la oxidación de biomoléculas orgánicas. La OXPHOS comprende una serie de reacciones de transferencia de electrones (ET) a través de complejos enzimáticos ubicados en la membrana mitocondrial interna (IMM), que en su conjunto constituyen la ETC (Figura 1) [3].

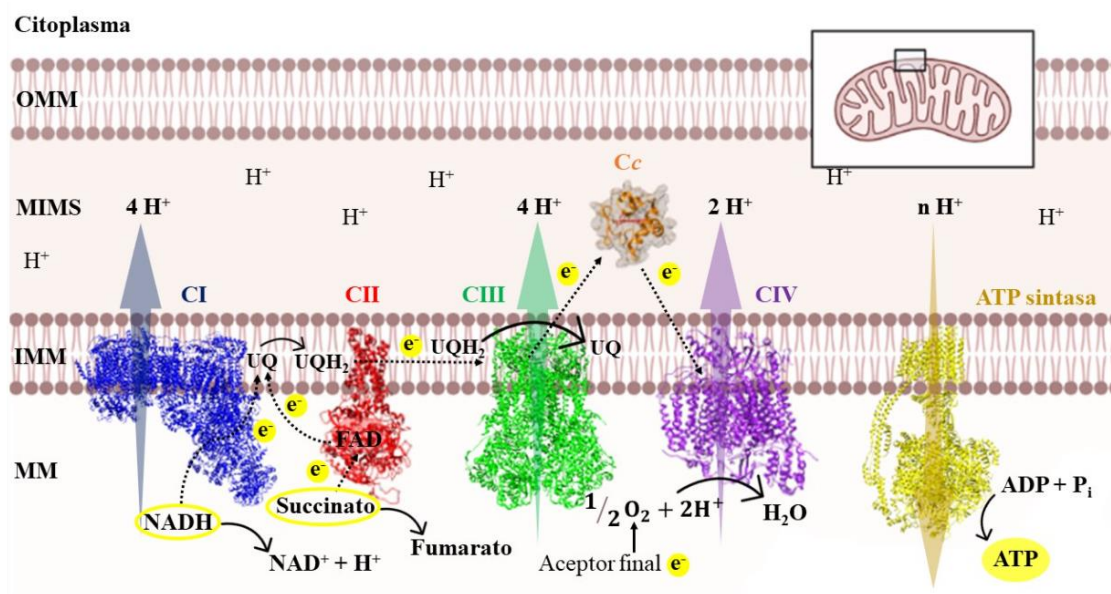


Figura 1. Cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC): componentes, ubicación intramitocondrial de los mismos y reacciones catalizadas. Complejo I (CI) (PDB: 5XTD) representado en azul, complejo II (CII) (PDB: 1ZOY) en rojo, complejo III (CIII) (PDB: 5XTE) en verde, complejo IV (CIV) (PDB: 5Z62) en morado, ATP sintasa (PDB: 5FIL) en amarillo, citocromo *c* (Cc) (PDB: 2N9J) en naranja (la apoproteína) con el grupo hemo *c* (HEC) en rojo y ubiquinona (UQ). La ultraestructura de la mitocondria se detalla a continuación; de arriba a abajo: membrana externa (OMM), espacio intermembrana (MIMS), membrana interna (IMM) y matriz (MM). Las flechas discontinuas indican un proceso de transferencia de electrones (ET). El NADH y el succinato constituyen las dos entradas principales de electrones en el sistema [4]. Imagen realizada en *BioRender* [5] y *UCSF Chimera* [6]. PDB: *Protein Data Bank*.

1.2 Citocromos y grupos hemo

Los citocromos son una clase de hemoproteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza que están presentes tanto en organismos eucariotas (como animales, plantas y levaduras) como procariotas (una gran variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas) y están involucradas principalmente en procesos de ET [7].

Los citocromos se clasifican de acuerdo con el tipo de grupo hemo que poseen como grupo prostético [8]. Generalmente, se clasifican en tres grupos principales: citocromos a, b y c [7]. El grupo hemo es un complejo entre un macrociclo tetrapirrónico denominado porfirina y un ion de hierro [9]. Desempeña funciones biológicas esenciales, como el transporte y almacenamiento de oxígeno (hemoglobina y mioglobina, respectivamente) o procesos de ET en el caso de diferentes citocromos [9].

1.3 Funciones del citocromo c

1.3.1 Transporte de electrones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial

La función principal del citocromo *c* (*Cc*) consiste en actuar como un transportador de electrones (EC) en la OXPPOS (Figura 1) [10]. El *Cc* realiza una transferencia de un solo electrón desde el dominio hidrosoluble del citocromo *c*₁ (*Cc*₁) [11] —proteína que, junto al citocromo *b* (*Cb*) y a la proteína de Rieske, constituye el centro catalítico del complejo III (CIII) [12]— al centro binuclear de cobre del CIV [13].

La presencia del *Cc* es indispensable para la funcionalidad de la ETC, hecho consistente con la observación de que mutantes *knockout* (KO) para el *Cc* en ratones mueren durante la gestación al empezar a depender energéticamente de la OXPPOS [14]. Por otra parte, y como se detallará más adelante, se cree que el *Cc* está implicado en el ensamblaje y la estabilidad estructural de varios de los complejos mitocondriales (MCs) y supercomplejos (MSCs) (estos últimos consisten en una disposición supramolecular de los MCs individuales, formando asociaciones estables [15]) en la ETC.

1.3.2 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada (PCD) [16] y es un proceso genéticamente controlado que consiste en la eliminación de células no deseadas de forma regulada [17]. Se distinguen dos rutas principales por las que la apoptosis puede tener

lugar, dependiendo de los estímulos que la induzcan: la intrínseca, desencadenada por estímulos de origen intracelular —como daño a DNA (DD) o hipoxia— y la extrínseca, iniciada por interacciones que involucran receptores transmembrana de la familia TNF (*Tumor Necrosis Factor*) [18]. Existe también otra ruta por la que la apoptosis puede tener lugar, denominada vía de la perforina/granzima, la cual es llevada a cabo por linfocitos T citotóxicos [19].

El Cc sale de la mitocondria cuando se dan condiciones proapoptóticas, iniciando la vía intrínseca de la apoptosis en mamíferos [10]. Una vez el Cc se ubica en el citosol, se une a APAF-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor 1*), formando un complejo proteico denominado apoptosoma que da lugar a la activación de las caspasas apoptóticas, hecho que en última instancia conduce a la apoptosis [10]. Recientemente se ha propuesto que, bajo estímulos apoptóticos, el Cc no solamente promueve la ejecución de la apoptosis activando rutas proapoptóticas, sino también inhibiendo rutas prosupervivencia mediante su interacción con un amplio número de proteínas extramitocondriales (Figura 2) [10,20]. Algunas de ellas guardan relación funcional [10]. Dicho bloqueo de las rutas prosupervivencia es, aparentemente, común a humanos y plantas [21].

1.3.3 Respuesta al daño en el DNA

La migración del Cc al núcleo es inducida por lesiones en el DNA como roturas de doble cadena [22] y tiene lugar de manera previa a la activación de caspasas apoptóticas [23]. Una vez en el núcleo, el Cc bloquea diferentes chaperonas de histonas (HChs) [22]. Tales HChs son: ANP32B (*Acidic leucine-rich Nuclear Phosphoprotein 32 family member B*), nucleolina (NCL), nucleofosmina (NPM), NRP1 (*Nucleosome assembly protein 1-Related Protein 1*) y SET/TAF-I β (*Suppressor of variegation, Enhancer of zeste and Trithorax/Template-Activating Factor-I β*) (Figura 2) [10,20].

Se ha propuesto la existencia de un rol dual para el Cc nuclear en un contexto de DD [22]. Según esta hipótesis, bajos niveles de lesiones en el DNA inducen la liberación de bajas concentraciones de Cc al núcleo, atenuando el ensamblaje de nucleosomas y extendiendo por tanto el tiempo disponible para que el DNA sea reparado. No obstante, si el DD persiste o aumenta, se incrementa la concentración de Cc en el núcleo, superando un límite concreto a partir del cual la hemoproteína secuestraría la gran mayoría de HChs, reprimiendo todos los procesos que dependan de la cromatina. Dicha situación conduce irreversiblemente a la ejecución de la PCD [22].

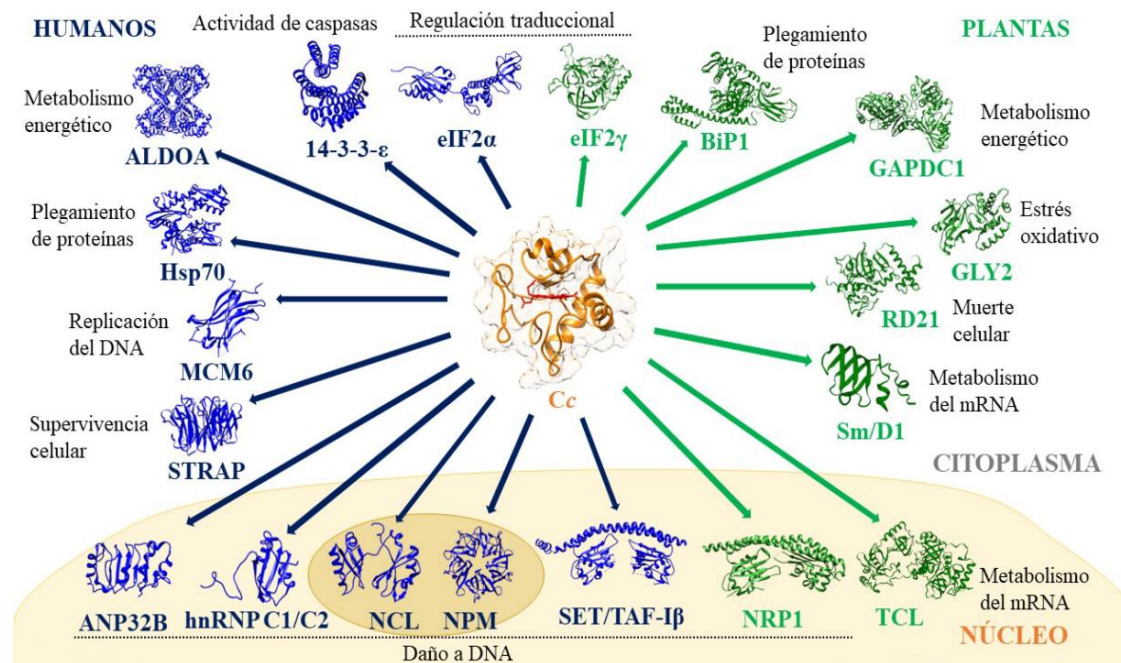


Figura 2. Dianas extramitocondriales del citocromo (Cc) (PDB: 2N9J) con funciones prosupervivencia. El apocitocromo *c* (ApoCc) se representa en naranja y el grupo hemo *c* (HEC) en rojo. Las proteínas coloreadas en azul son de origen humano y las indicadas en verde corresponden a la planta *Arabidopsis thaliana*. Dichas proteínas son, en sentido contrario a las agujas del reloj: eIF2 α (*Eukaryotic translation Initiation Factor 2 subunit Alpha*) (PDB: 1Q8K), 14-3-3- ϵ (PDB: 2BR9), ALDOA (*Fructose-bisphosphate Aldolase A*) (PDB: 5KY6), HSP70 (*Heat Shock 70 kDa Protein 5*) (PDB: 5F1X), MCM6 (*Minichromosome Maintenance complex 6*) (PDB: 4KG9), STRAP (*Serine-Threonine kinase Associated Protein*), ANP32B (*Acidic leucine-rich Nuclear Phosphoprotein 32 family member B*) (PDB: 2ELL), hnRNP C1/C2 (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C1 and C2*) (PDB: 2MXY), nucleolina (NCL) (PDB: 2KRR), nucleofosmina (NPM) (PDB: 5EHD), SET/TAF-I β (*Suppressor of variegation, Enhancer of zeste and Trithorax/Template-Activating Factor-I β*) (PDB: 2E50), NRPI (*Nucleosome assembly protein 1-Related Protein 1*) (PDB: 5DAY), TCL (*Transcriptional Coactivator-Like*), Sm/D1 (*Small nuclear ribonucleoprotein D1*), RD21 (*Cysteine proteinase Responsive to Desiccation-21*), GLY2 (*Glyoxalase II*) (PDB: 2Q42), GAPDC1 (*Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase C subunit 1*) (PDB: 4Z0H), BiP1 (*Luminal-Binding Protein 1*) y eIF2 γ (*Eukaryotic translation Initiation Factor 2 subunit Gamma*). Se indican los procesos en los que se encuentran implicadas las proteínas correspondientes. Se indica también la ubicación intracelular de las mismas (NCL y NPM se encuentran en el nucleolo). Las estructuras del Cc y de 14-3-3- ϵ , HSP70, ALDOA, GAPDC1 y GLY2 se han representado con UCSF Chimera [6]. Las estructuras de STRAP, TCL, Sm/D1, RD21, BiP1 y eIF2 γ se han construido como modelos de homología utilizando SWISS-MODEL [24] y basándose en los PDBs 3JAP, 3BDL, 4V98, 5EGW, 7O6R y 6QG0, respectivamente. PDB: Protein Data Bank.

2 Estructura del citocromo c

Los citocromos *c* se caracterizan por presentar un grupo hemo *c* (HEC) como grupo prostético [8].

El citocromo *c* mitocondrial (referido como Cc) es la proteína abordada en el presente trabajo. El Cc es una proteína pequeña (12,4 kDa), monomérica, globular, hidrosoluble y

catiónica de alrededor de 104 aminoácidos perteneciente a la clase de las proteínas todo α [10,25]. Su estructura tridimensional está conservada en gran medida a lo largo de la evolución [8].

El *Cc* presenta cuatro hélices α dispuestas alrededor del HEC y unidas por lazos irregulares [26]. La unión del HEC al apocitocromo *c* (Apo*Cc*) es covalente, pues consiste en dos enlaces tioéter entre los dos grupos vinilo del HEC y las cadenas laterales de los residuos Cys14 y Cys17. Asimismo, el átomo de hierro del HEC está coordinado axialmente con las cadenas laterales de los residuos His18 y Met80 (Figura 3A) [8].

El HEC se encuentra alojado en el interior de un bolsillo hidrofóbico, aunque está parcialmente expuesto al solvente, de manera que el *Cc* pueda participar en reacciones redox (Figura 3B) [27].

La estructura del *Cc* varía en función de su estado redox [28], así como de las modificaciones postraduccionales (PTMs) que experimenta, como se explicará más adelante.

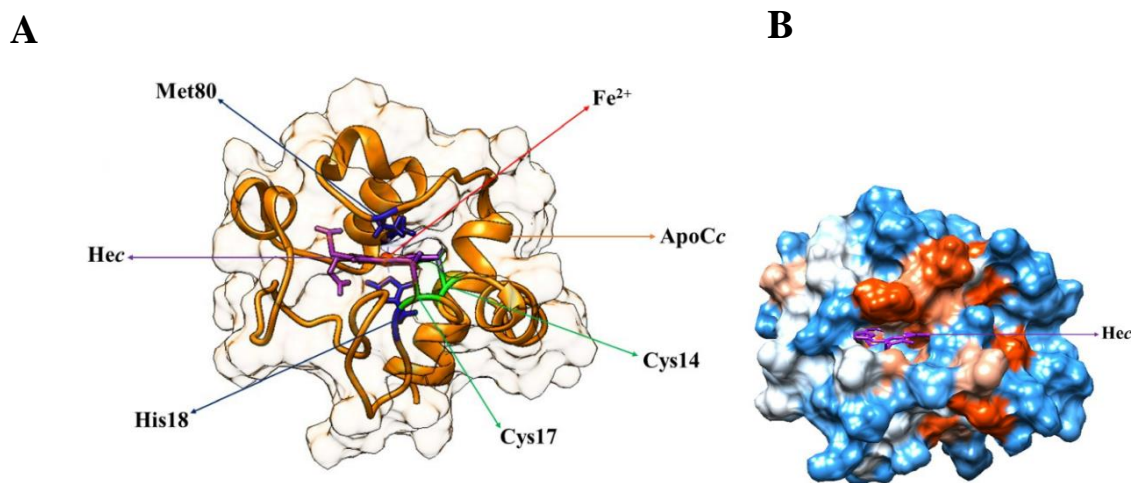


Figura 3. A) Estructura tridimensional (diagrama de Richardson [29]) **del citocromo *c* (*Cc*) humano (PDB: 2N9I).** El apocitocromo *c* (Apo*Cc*) se encuentra representado en naranja. Los residuos implicados en la unión covalente del grupo hemo *c* (HEC) al Apo*Cc* (Cys14 y Cys17) se indican en verde. Los residuos que constituyen los ligandos axiales del HEC (His18 y Met80) aparecen en azul. El grupo prostético HEC se representa en morado, con el átomo de hierro en rojo. **B) Superficie de hidrofobicidad del *Cc* humano (PDB: 2N9I)** mostrando el bolsillo hidrofóbico donde se aloja el HEC (representado en morado). El grado de hidrofobicidad viene determinado por la escala de Kyte-Doolittle [30], de manera que las regiones superficiales que presentan una mayor hidrosolubilidad aparecen representadas en azul, las áreas más hidrofóbicas se indican en un tono rojizo, y aquellas regiones con un valor de hidrofobicidad de 0,0 aparecen en blanco. Imágenes realizadas en UCSF Chimera [6]. PDB: Protein Data Bank.

3 Citocromo *c* en el metabolismo energético

3.1 Sitios de unión del citocromo *c* a los Complejos Mitocondriales III y IV

Se han descrito dos tipos de sitios de unión al Cc tanto en el CIII como en el CIV en función de sus afinidades y la productividad o no de los mismos en términos de ET. Dichos sitios son denominados *proximal* y *distal* (Figura 4) [11].

Los sitios *proximales* se caracterizan por poseer una elevada afinidad por el Cc y por ser productivos en términos de ET. En el caso de la interacción Cc₁-Cc, implica que los grupos hemo de ambas proteínas se encuentren a una distancia lo suficientemente corta como para posibilitar la ET. La unión del Cc a los sitios proximales tiene lugar gracias al área cargada positivamente (rica en residuos de lisina) que rodea su *bolsillo hémico*, que interactúa con las superficies cargadas negativamente de los MCs [11]. Puesto que el Cc presenta una carga neta positiva, tiene la capacidad de deslizarse por dichas regiones [11].

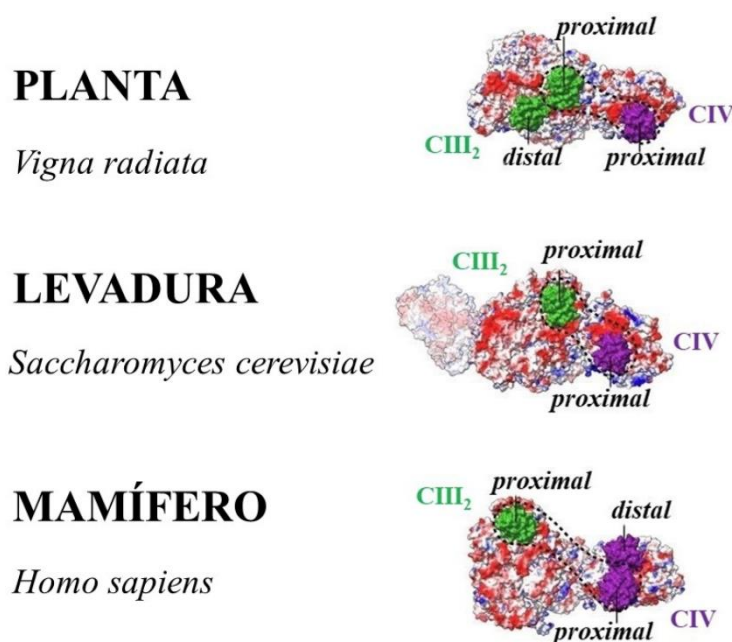


Figura 4. Sitios de unión del citocromo *c* (Cc) al complejo III (CIII) y al complejo IV (CIV) ensamblados en supercomplejos mitocondriales (MSCs) en distintos organismos eucariotas: la planta *Vigna radiata* (PDB: 7JRP; parte superior), el humano (PDB: 5XTH; parte intermedia), y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 6HU9; parte inferior). Se indican los sitios *proximales* y *distales* de cada complejo (MC): verde (CIII) y morado (CIV). El área circundante a los sitios proximales de ambos MCs se señala con líneas discontinuas. Asimismo, cada MC que forma parte de los respectivos MSCs se encuentra indicado en las posiciones correspondientes. Los subíndices numéricos indican el número de monómeros de los respectivos MCs. Imagen adaptada de [11]. PDB: *Protein Data Bank*.

Por otra parte, los sitios *distales* presentan una baja afinidad por el Cc y, curiosamente, son improductivos en cuanto a la ET [11]. En el caso de la interacción Cc₁-Cc, se debe a

una distancia entre los grupos hemo de ambas proteínas demasiado grande. El Cc emplea un área menos definida en su unión a los sitios distales que a los proximales, como cabría esperar teniendo en cuenta su menor afinidad [31]. Se cree que la función de los sitios distales consiste en actuar como una plataforma que facilita la canalización de moléculas de Cc entre el CIII y el CIV cuando éstos se encuentran formando MSCs (Figura 5B). Este hecho podría suponer una mejora en la capacidad del Cc como EC desde el CIII al CIV (aumentando por tanto la eficiencia de la OXPHOS). Se piensa que los sitios distales sirven también para atraer más moléculas de Cc y acercarlas a los sitios proximales [11].

3.2 Mecanismos de transferencia electrónica del citocromo *c*

3.2.1 Según el modelo de plasticidad de organización de la cadena de transporte de electrones mitocondrial

Actualmente, el modelo prevalente que explica la disposición de los MCs en la ETC es el conocido como “modelo de plasticidad” [32]. Dicho modelo propone la existencia de un balance dinámico entre MCs libres y MCs ensamblados en MSCs (Figura 5) con el fin de permitir la adaptabilidad de la ETC a cambios en el ambiente intracelular o al uso de diferentes fuentes de carbono [33].

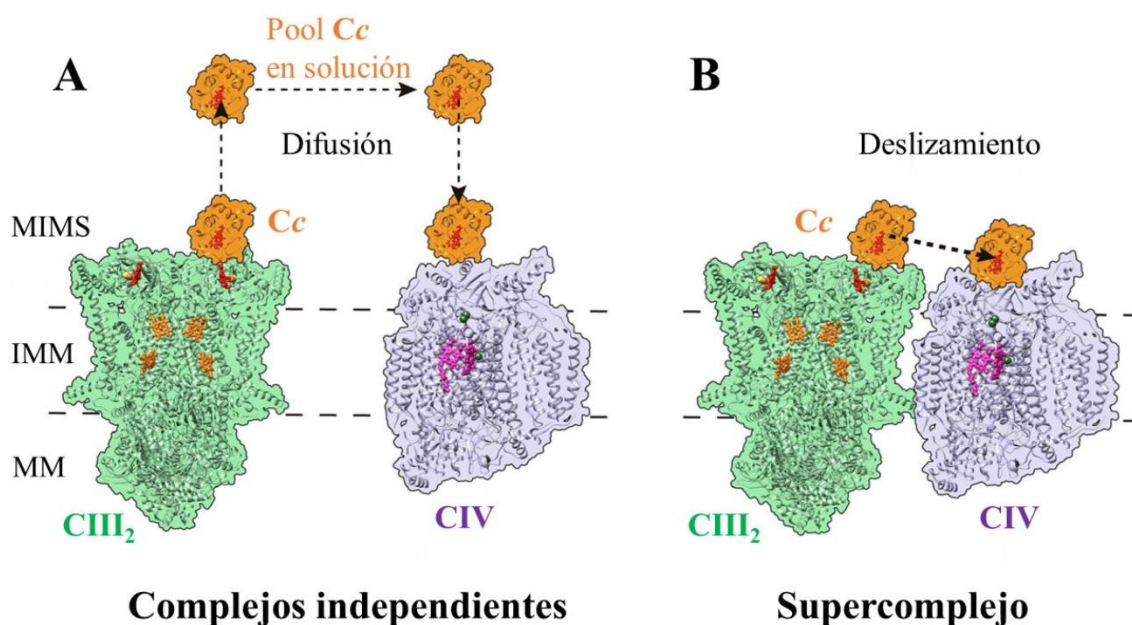


Figura 5. Mecanismos de transferencia electrónica (ET) del citocromo *c* (Cc) según la organización de los complejos mitocondriales (MCs) en la cadena de transporte de electrones (ETC). Cc en naranja, complejo III (CIII) en verde y complejo IV (CIV) en morado. **A)** Los MCs se encuentran libres. La ET mediada por el Cc tiene lugar principalmente mediante difusión de la hemoproteína en el espacio intermembrana (MIMS). **B)** Los MCs se asocian formando supercomplejos (MSCs). Los sitios distales del CIII y el CIV permiten la ET mediada por el Cc mediante el deslizamiento de la hemoproteína por sus superficies. Imagen modificada de [11].

La mayoría del C_c se encuentra unido a la IMM [34]. De dicha fracción, se estima que aproximadamente el 85 % del C_c está unido débilmente a la IMM y puede participar en procesos de ET, mientras que el 15 % restante está unido fuertemente y no está disponible para llevar a cabo reacciones de ET [34].

En el caso de que los MCs se encuentren libres, la ET mediada por el C_c es llevada a cabo principalmente por la subpoblación libre en el espacio intermembrana (MIMS) mediante búsqueda difusional de CIII y CIV (Figura 5A) [11]. Por otra parte, en un contexto de MCs ensamblados en MSCs, el C_c lleva a cabo la ET entre el CIII y el CIV deslizándose sobre las superficies de dichos MCs (Figura 5B) [11]. Este último mecanismo de ET es posibilitado por la presencia de sitios distales de unión al C_c en el CIII y en el CIV (Figura 4) [11].

3.2.2 A corta distancia

El transporte de electrones en la ETC es primordialmente llevado a cabo por proteínas redox (Figura 1), las cuales transportan los electrones de uno en uno [35].

En las reacciones redox, los electrones fluyen espontáneamente desde las especies que poseen un valor de potencial redox (RP) más negativo a aquellas que tienen un valor de RP mayor más positivo, tendencia que es posible observar en los ECs de la ETC [36]. Por tanto, la ET se ve favorecida desde el punto de vista termodinámico por el incremento en la diferencia de RP de las especies implicadas [11].

Está ampliamente aceptado que la ET interproteica a corta distancia implica contacto físico entre las mismas. En este sentido, se ha observado que la interacción física entre el C_{c1} y el C_c provoca un aumento en la diferencia de RP entre ambas hemoproteínas, lo cual favorece el carácter reductor del C_{c1} y por tanto la ET al C_c (Figura 6) [11].

3.2.3 A larga distancia

La ET entre proteínas cuya interacción no implica contacto físico se conoce como transferencia de electrones a larga distancia, y requiere la presencia de moléculas conductoras de electrones [11].

La velocidad de la transferencia de electrones (k_{ET}) a larga distancia depende de la distancia a la que se encuentren las proteínas entre las que va a tener lugar la ET. A medida que aumenta dicha distancia, la k_{ET} del proceso disminuye [37]. El parámetro dependiente

de distancia que refleja esta disminución de la k_{ET} entre proteínas que no interactúan físicamente se conoce como β (*Distance-Decay Parameter*) [11].

Se cree que la ET a larga distancia entre proteínas redox interactoras se ve favorecida por la presencia de capas ordenadas de moléculas de agua en el espacio existente entre las mismas (Figura 7) [35]. Aunque teóricamente la molécula de agua se caracteriza por su mala conductividad eléctrica, la presencia de una capa ordenada de moléculas de agua en la región local del espacio interproteico puede proveer caminos para la ET [11].

Resulta interesante la observación de que en el complejo Cc-CIV de mamíferos el espacio existente entre ambas proteínas contiene tres capas de moléculas de agua, hecho consistente con el modelo de ET a larga distancia [38].

Sin embargo, se desconoce el rol de las moléculas de agua en la mejora de la ET, así como la identidad de los ECs implicados en tal proceso [35]. Posiblemente se deba a la presencia de pequeñas moléculas que actúen como ECs en la proximidad de las proteínas [35].

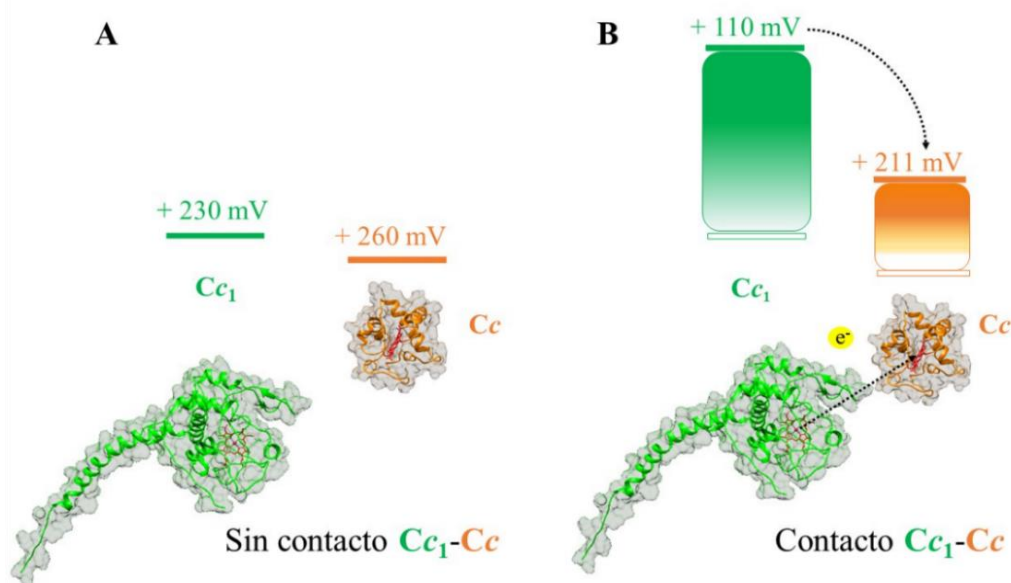


Figura 6. Modulación del potencial redox (RP) del citocromo c (Cc) (PDB: 2N9J) por contacto físico con el citocromo c1 (Cc1) (PDB: 5XTE). Apocitocromo c (ApoCc) representado en naranja y Cc1 en verde (la apoproteína). Los grupos hemo c (HEC) de ambas hemoproteínas se indican en rojo. **A)** No hay contacto físico entre ambas hemoproteínas. En este caso, los valores de RP indicados para cada proteína corresponden a aquellos medidos para las proteínas libres en solución acuosa [11]. El valor de RP del Cc1 se ha obtenido de [39] y el del Cc de [40]. **B)** Sí hay interacción física entre ambas hemoproteínas. Como consecuencia del contacto físico, se produce un incremento en la diferencia del valor de RP entre las proteínas interactoras. Los valores de RP del Cc1 y del Cc se han obtenido de [39]. Las flechas discontinuas indican que se da un proceso de transferencia de electrones (ET). Imagen elaborada en UCSF Chimera [6]. PDB: *Protein Data Bank*.

La ET a larga distancia entre el Cc y sus dianas de la ETC (CIII y CIV) podría suponer una mayor eficiencia del proceso de ET comparado con la visión tradicional de ET interproteica a corta distancia ([Figura 7](#)), lo cual resultaría ventajoso en el ajetreado ambiente intracelular [[11](#)].

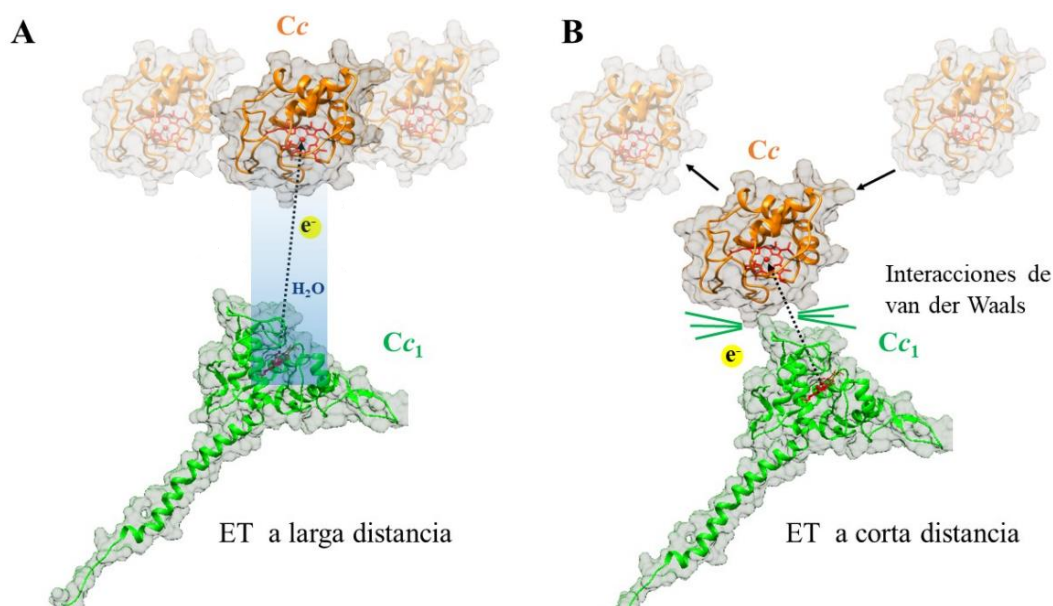


Figura 7. Comparativa entre mecanismos de transferencia electrónica (ET) del citocromo c_1 (Cc_1) (PDB: 5XTE) al citocromo c (Cc) (PDB: 2N9J): a larga y a corta distancia. Apocitocromo c (ApoCc) representado en naranja y Cc_1 en verde (la apoproteína). Los grupos hemo c (HEC) de ambas hemoproteínas aparecen en rojo. **A)** ET Cc_1 - Cc a larga distancia. La presencia de moléculas de agua en el espacio entre ambas proteínas permite el proceso de ET sin necesidad de que interactúen físicamente [[11](#)]. **B)** ET Cc_1 - Cc a corta distancia. Las fuertes interacciones de van der Waals que se establecen entre las proteínas interactoras a corta distancia conllevan una menor velocidad de transferencia de electrones (k_{ET}) [[11](#)]. En ambos casos, las flechas negras discontinuas indican la ET desde el HEC del Cc_1 al HEC del Cc . Imagen realizada en UCSF Chimera [[6](#)]. PDB: Protein Data Bank.

3.3 Papel del citocromo c en la estabilidad estructural de los complejos mitocondriales

El rol del Cc en la ETC no se limita a actuar como EC del CIII al CIV ([Figura 1](#)), sino que también está implicado en el correcto ensamblaje y en la estabilidad estructural de varios de los MCs [[10](#)], como se detallará a continuación.

En un estudio en el que utilizaron fibroblastos de ratón (*Mus musculus*) deficientes o KO para el Cc, se observó una disminución en los niveles de las subunidades I, II y III del CIV [[41](#)]. En ambos casos, dichos fibroblastos no fueron capaces de ensamblar el CIV, o si lo hicieron, éste era muy inestable ([Figura 8](#)). Tras la reintroducción de los genes que codifican el Cc en los fibroblastos KO, se pudo detectar la presencia de unidades de CIV correctamente ensambladas. Por otra parte, tras la introducción de una versión no

funcional como EC del Cc en dichos fibroblastos, no se apreció una recuperación en el ensamblaje del CIV. Estas observaciones indican que, en mamíferos, tanto la presencia como la funcionalidad redox del Cc son requisitos indispensables para un CIV fisiológicamente activo [41].

En el mismo estudio se observó también en los dos casos ya mencionados (fibroblastos de ratón KO y deficientes en Cc) una ausencia de complejo I (CI) [41]. Este hecho es consistente con estudios que señalan la inestabilidad del CI en ausencia de un CIV correctamente ensamblado en mamíferos [42], siendo posiblemente la falta de CIV en los casos ya mencionados la que a su vez provocó la ausencia de CI (Figura 8) [41]. La reintroducción del Cc en los fibroblastos KO ocasionó una recuperación parcial en el ensamblaje del CI [41]. Otro estudio en fibroblastos de ratón sugiere que esta dependencia del CI del CIV es más marcada aún en células en división activa [42].

En el caso de los fibroblastos KO para el Cc del estudio ya citado, además de la ausencia de CI y de CIV, se observó también una disminución en los niveles de CIII. En dichos fibroblastos, la actividad del CIII se encontró reducida en un 50 % frente a los fibroblastos silvestres (WT) (Figura 8) [41].

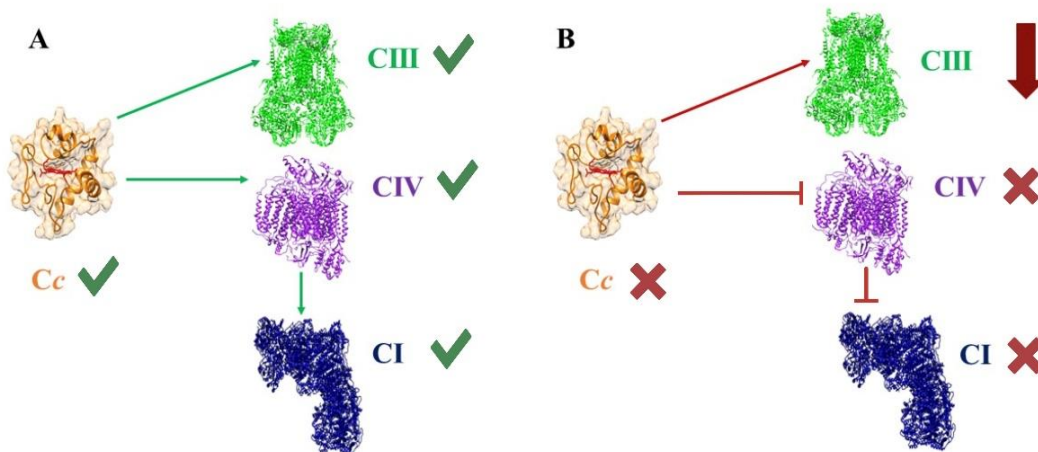


Figura 8. Efecto de la presencia y ausencia de citocromo c (Cc) sobre la estabilidad, niveles y actividad enzimática de los complejos mitocondriales (MCs) en fibroblastos de ratón. Cc (PDB: 2N9J) representado en naranja (la apoproteína) con el grupo hemo c (HEC) en rojo, complejo III (CIII) (PDB: 5XTE) en verde, complejo IV (CIV) (PDB: 5Z62) en morado y complejo I (CI) (PDB: 5XTD) en azul. **A)** Presencia de Cc. Los niveles de CIII y de las subunidades I, II y III del CIV son los habituales. La presencia de CIV permite a su vez la de CI. **B)** Ausencia de Cc. Los niveles de CIII se ven reducidos y su actividad enzimática disminuye significativamente. La falta de Cc provoca una disminución en la abundancia de las subunidades I, II y III del CIV, lo que conlleva la inestabilidad del CIV. En este caso, los niveles de CIV son indetectables y su actividad enzimática es inexistente [41]. La falta de Cc provoca indirectamente la ausencia de CI [42]. Imagen elaborada en UCSF Chimera [6] y BioRender [43]. PDB: Protein Data Bank.

Ensayos en levaduras (*S. cerevisiae*) demostraron que aquellos individuos que no poseen los dos genes que codifican el *Cc* son incapaces de ensamblar el CIV [44]. A diferencia de lo que sucede en mamíferos, en levaduras no se requiere la presencia de un *Cc* catalíticamente activo para el correcto ensamblaje del CIV, pues se observaron en mutantes que poseían un *Cc* no funcional como EC unos niveles de CIV cercanos a los normales [44]. Este hecho apunta a un rol solamente estructural del *Cc* en el ensamblaje y la estabilidad del CIV en levaduras [44]. En dicho estudio, la falta de *Cc* no tuvo efectos detectables sobre la estabilidad de los demás MCs de la ETC [44], aunque cabe mencionar que las levaduras carecen de CI [41].

De manera similar a como se ha observado en mamíferos y en levaduras, existe evidencia de que en plantas el *Cc* también se encuentra involucrado en la estabilidad del CIV. En este sentido, un estudio con mutantes de *A. thaliana* deficientes en *Cc* demostró una disminución de entre el 50 % y el 90 % en la abundancia de las diferentes subunidades que componen el CIV [45]. Como cabría esperar, dicha disminución fue acompañada de una menor cantidad de CIV adecuadamente ensamblado. La actividad del CIV se vio drásticamente afectada, reduciéndose a un 25 % de los niveles que mostraron las plantas WT. Curiosamente, en dichos mutantes se apreció también un ligero incremento en la abundancia de las diferentes subunidades del complejo II (CII), que, sin embargo, no dio lugar a una mayor actividad enzimática (posiblemente debido a menores niveles de activadores alostéricos como el ATP) [45].

La observación de que en organismos tan filogenéticamente distantes como mamíferos [41,42], plantas [45] y levaduras [44] la falta de *Cc* tiene consecuencias sobre el ensamblaje y la estabilidad (y, por tanto, la actividad) de varios de los MCs (particularmente el CIV) apunta a la existencia de un rol conservado evolutivamente para esta hemoproteína en el ensamblaje de los MCs [10]. Sin embargo, actualmente se desconoce el mecanismo molecular subyacente al papel del *Cc* en el ensamblaje de los MCs [44].

3.4 Papel del citocromo *c* en la funcionalidad y ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales

Se han podido aislar MCs ensamblados en MSCs *in vivo*, los cuales se denominan frecuentemente como “respirasomas”. Sin embargo, para ser considerados como verdaderos respirasomas, dichos MSCs deberían ser capaces de respirar (desencadenar

un consumo de oxígeno) [46]. La capacidad de los MSCs de respirar requiere de la integración en los mismos de CI (y/o CII), CIII, CIV y los dos ECs móviles de la ETC: ubiquinona (UQ) y Cc [46], además de ser capaces de llevar a cabo una ET entre sus componentes y hacia el oxígeno [33]. Por tanto, el Cc emerge como un factor clave que permite a los MSCs actuar como unidades respiratorias funcionales (respirasomas) [46]. Además, se ha detectado la presencia de Cc en diferentes MSCs [46], por lo que se ha hipotetizado que podría estar implicado directamente en la estabilidad de los mismos [31].

En un estudio con fibroblastos de ratón KO para el Cc detectaron unos niveles de cardiolipina (CL) (el principal lípido al que se encuentra unido el Cc en condiciones homeostáticas [47]) reducidos en un 22 % frente a los WT [41]. La CL está implicada en el anclaje a la membrana de los MSCs [41]. De esta forma, niveles más bajos de CL repercuten negativamente sobre la estabilidad de los MSCs [48].

En base a estas observaciones, el Cc podría estar implicado en la estabilidad de diversos MSCs, ya sea indirectamente permitiendo la presencia de unos niveles adecuados de CL [41], o de manera directa mediante un mecanismo por ahora desconocido [31].

A su vez, la función de los MSCs no se conoce con exactitud [46]. Los MSCs se caracterizan estructuralmente por presentar una disminución en la distancia entre los MCs individuales, por lo que se ha propuesto que, como consecuencia, darían lugar a un proceso de ET más eficiente [49]. Otras funciones que se han sugerido para los MSCs son la implicación de los mismos en la estabilidad de MCs individuales y la minimización de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) [50].

3.5 Papel del citocromo c en la dinámica y funcionalidad mitocondrial

La funcionalidad mitocondrial se regula mediante los procesos dinámicos de fusión y fisión de sus membranas. En esta línea, la fusión mitocondrial resulta óptima para la generación de ATP mediante la OXPHOS. Por otra parte, la fisión mitocondrial genera nuevas mitocondrias de menor tamaño, más fáciles de distribuir en células en división mitótica [51].

La CL tiene una gran relevancia sobre la dinámica mitocondrial, pues se encuentra implicada en los procesos de fusión y fisión [41]. Teniendo en cuenta que la presencia de Cc permite que existan unos niveles adecuados de CL [41], posiblemente el Cc esté implicado en la dinámica (y, por tanto, la funcionalidad) mitocondrial.

4 Regulación del papel del citocromo *c* en el metabolismo energético por modificaciones postraduccionales

Las PTMs de proteínas constituyen un mecanismo mediante el cual se regula la funcionalidad de las mismas [52]. Debido a la gran importancia fisiológica del Cc, su funcionalidad se encuentra estrictamente regulada por PTMs [53,54]. Las PTMs que experimenta el Cc alteran sus propiedades fisicoquímicas y las interacciones con sus diferentes dianas, controlando de esta forma su funcionalidad [27]. Los efectos que las PTMs ejercen sobre el Cc dependen del tipo de PTM y de qué residuos concretos son afectados [27]. A continuación, se analizarán aquellas PTMs que regulan el papel del Cc en el metabolismo energético.

4.1 Fosforilación

El Cc es sujeto a fosforilación en los residuos Thr28, Ser47, Tyr48, Thr58 y Tyr97 *in vivo* (Figura 9A) [27]. No obstante, la quinasa implicada en tal proceso se desconoce [27]. Se ha propuesto que dicha quinasa podría ser la adenosín monofosfato (AMP) quinasa [55]. Otros autores han sugerido que la quinasa involucrada en la fosforilación de residuos de tirosina del Cc sería SYK (*Spleen Tyrosine Kinase*) [56].

Entre el 60 % y el 80 % del Cc presente en el riñón de ternera (*Bos taurus*) se encontró fosforilado en el residuo Thr28 *in vivo* (Figura 9A) [55]. El efecto funcional que dicha PTM ejerce sobre el Cc se ha estudiado tanto *in vivo* como *in vitro*, y en ambos casos se ha detectado una inhibición parcial en la reacción del Cc con el CIV [55]. Además, se ha comprobado que esta PTM disminuye la afinidad del Cc por el sitio distal del CIII (Figura 4), lo cual impediría la canalización de moléculas de Cc a través de MSCs (Figura 5B) [40] así como una mayor cantidad de moléculas de Cc en los sitios proximales.

Como mínimo el 35 % del Cc presente en el cerebro de cerdo (*Sus scrofa*) se encontró fosforilado en el residuo Ser47 (Figura 9A) [57]. Dicha PTM inhibió significativamente la oxidación del Cc por el CIV (Figura 1) [57]. En este caso, y como resultado de dicha inhibición, disminuyó el flujo de electrones (EF) en la ETC [57]. Esto permite que haya unos valores intermedios (y saludables) de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), lo cual da lugar a una producción de ATP suficiente a la vez que evita la sobreproducción de ROS, lo cual es común observar a valores patológicamente elevados de $\Delta\Psi_m$ [55,57].

Se identificó el Cc fosforilado en el residuo Tyr48 en el hígado de ternera ([Figura 9A](#)) [58]. Un ensayo con Ccs mutantes fosfomiméticos (PMs) (se sustituye un aminoácido por otro, ya sea canónico o no, con el fin de imitar otro aminoácido fosforilado [27]) reveló que los mismos poseían unos valores de RP claramente menores que el Cc WT (Cc no fosforilado) [59]. De hecho, el valor de RP de uno de los PMs (Tyr48Glu) coincidía con el del CIII, lo cual se espera que inhiba la ET al Cc y por tanto el EF en la ETC [59]. Además, se ha comprobado que la fosforilación del residuo Tyr48 del Cc inhibe *in vivo* su reacción con el CIV en aproximadamente un 50 % [58]. Dicha reacción se vio inhibida en un 30 % cuando se empleó el PM Tyr48Glu, mostrando un comportamiento similar [59].

En otro estudio con un PM en el que se sustituyó el residuo Tyr48 por el aminoácido artificial *p*-carboxi-metil-L-fenilalanina (*p*CMF), se observó que dicho PM poseía una menor afinidad por el [sitio distal](#) del CIII ([Figura 4](#)) [60]. Como resultado, la canalización de moléculas de Cc en MSCs ([Figura 5B](#)) se vio inhibida [60], provocando una ralentización del EF en la ETC [60]. Curiosamente, dicho PM mostró una mayor afinidad por el sitio proximal del CIII ([Figura 4](#)), de manera que el reemplazo de moléculas de Cc en dicho sitio se vio inhibido. Este hecho provoca un bloqueo de la ET al Cc y por tanto del EF en la ETC [60], siendo estas conclusiones consistentes con las obtenidas en otros estudios [58,59].

En el hígado de rata (*Rattus norvegicus*), el Cc se encontró fosforilado en el residuo Thr58 *in vivo* [61]. Se realizó un ensayo con los PMs Thr58Glu y Thr58Ile con el fin de estudiar la funcionalidad subyacente a la fosforilación del Cc en Thr58 [61]. Se observó *in vitro* en dichos PMs que la oxidación del Cc por el CIV fue un 45 % menor que la que mostró el WT en el caso del PM Thr58Glu y un 25% menor en Thr58Ile. Cuando se expresaron dichos PMs en fibroblastos de ratón KO para el Cc se detectaron unas tasas respiratorias reducidas en un 68 % y en un 25 %, respectivamente. Como cabría esperar, hubo también una disminución en los niveles celulares de ATP (de un 66 % para Thr58Glu y de un 36 % para Thr58Ile). En línea con la disminución en la respiración, los PMs Thr58Glu y Thr58Ile mostraron unos valores de $\Delta\Psi_m$ considerablemente menores que los del Cc WT, los cuales permitirían un EF eficiente en la ETC previniendo a su vez la aparición de estrés oxidativo (OS) [61].

Se detectó la presencia de Cc fosforilado en el residuo Tyr97 ([Figura 9A](#)) en el cerebro de cerdo tras aplicar un tratamiento posisquémico con insulina [62]. Un estudio posterior

trató de analizar el efecto funcional de dicha PTM utilizando el PM Tyr97pCMF [63]. Observaron que dicho PM mostró un aumento en la capacidad de reducir el CIV cuando éste se integra en [MSCs](#) frente al WT, debido probablemente a la mayor afinidad del PM por el CIV que los autores detectaron. Cuando se empleó dicho PM apreciaron también unos menores niveles de ROS en comparación al WT. Los autores concluyeron que esta PTM daría lugar a una ET más eficiente por parte del Cc cuando actúa como EC en MSCs [63].

A pesar de las diferencias funcionales dependientes de qué residuos concretos son fosforilados, hay estudios que concluyen que la polifosforilación del Cc en sus residuos de tirosina inhibe su papel como EC en la ETC [56]. Es de esperar que, como consecuencia, la actividad de la ETC en su conjunto disminuya y, por consiguiente, la síntesis mitocondrial de ATP.

4.2 Nitración

La nitración del Cc consiste en la introducción de un grupo nitro en el anillo fenólico de un residuo de tirosina [27]. La presencia de especies reactivas de nitrógeno promueve la aparición de esta PTM [64], la cual se ha podido detectar *in vivo* en humanos [65]. Los únicos residuos en los que se ha detectado la nitración del Cc *in vivo* son Tyr67 y Tyr74 ([Figura 9A](#)) [27].

Un estudio demostró que la polinitración del Cc ocasiona en la proteína una disminución drástica (de alrededor de 350 mV) en su valor de RP [64]. Termodinámicamente, dicha disminución inhibe la reacción del Cc con el CIV ([Figura 1](#)), lo cual pudieron confirmar. En el mismo estudio se analizó también el efecto funcional de dicha PTM en Ccs mutantes nitrados en residuos de tirosina específicos. Comprobaron que todos ellos mostraron una menor reactividad por el CIV en comparación a la proteína WT, particularmente los mutantes nitrados en Tyr67 y Tyr74 ([Figura 9A](#)). Concluyeron que la menor capacidad de reducción del CIV por el Cc polinitrado se debe mayoritariamente a la nitración de dichos residuos en concreto [64].

Otros autores estudiaron la funcionalidad del Cc mononitrado *in vitro* [66]. Observaron que el uso de dicha proteína en vez de la WT inhibió la formación del $\Delta\Psi_m$, repercutiendo negativamente sobre la síntesis de ATP. Descubrieron también que el Cc nitrado fue más susceptible de ser oxidado por H₂O₂ [66]. La mayor capacidad de oxidación del Cc por

moléculas distintas al CIV promueve un consumo de sustratos desacoplado de la formación del gradiente electroquímico requerido para la síntesis de ATP, impidiendo la provisión de un suministro energético celular adecuado [66].

Cabe mencionar que la nitración y la fosforilación de un mismo residuo de tirosina son procesos mutuamente excluyentes [67]. Por tanto, se ha propuesto que ambas PTMs podrían actuar antagónicamente entre sí [27].

4.3 Acetilación

El Cc es sujeto a acetilación en diferentes residuos de lisina, aunque únicamente se ha detectado la acetilación de sus residuos Lys8 y Lys53 *in vivo* (Figura 9A) [27]. La acetilación de residuos de lisina puede tener lugar gracias a la acción de lisina acetiltransferasas [68] o de manera no enzimática en la matriz mitocondrial (MM) (Figura 1) debido a altas concentraciones de acetyl-CoA y valores de pH alcalinos [69]. Sin embargo, se desconoce qué acetiltransferasa está implicada en la acetilación del Cc [70].

La acetilación del residuo Lys8 del Cc se descubrió en un análisis proteómico de mitocondrias de hígado de ratón [71]. Dicha PTM fue observada en condiciones de ayunas, pero no cuando los ratones fueron alimentados [71]. Este residuo está implicado en la interacción física del Cc con el Cc₁ (del CIII) [72]. Se realizó un estudio en el que se reemplazó dicho residuo por uno de glutamina, con el fin de imitar la acetil-lisina y estudiar el efecto funcional subyacente a dicha PTM [70]. Observaron que el Cc mutante acetilado (AcM) mostró una mayor afinidad por el Cc₁ en comparación al Cc WT. Además, detectaron una disminución de aproximadamente un 45 % en la capacidad del AcM Lys8Gln de reducir el CIV, disminuyendo a su vez el EF en la ETC [70].

Por otra parte, se identificó la acetilación del Cc en el residuo Lys53 en células de cáncer de próstata [73]. En el mismo trabajo donde se describió dicha PTM generaron un AcM (Lys53Gln) con el fin de estudiar la funcionalidad del mismo [73]. Descubrieron que dicho AcM presentó una disminución de aproximadamente un 35 % en su reactividad con el CIV frente al Cc WT. Se hipotetizó que tal cambio en reactividad inhibiría la OXPPOS, promoviendo en su lugar el “efecto Warburg” (fenómeno propio de las células cancerosas por el que las mismas recurren a la glucólisis en vez de a la OXPPOS aunque se encuentren en condiciones aerobias [74]) [73].

En otro estudio en el que también trabajaron con el AcM Lys53Gln pudieron corroborar una disminución significativa en la capacidad de dicho AcM de ser oxidado por el CIV [70]. Concluyeron que la base estructural subyacente a la menor capacidad del AcM Lys53Gln de reaccionar con el CIV podría deberse a una modificación en el mecanismo de reconocimiento molecular entre ambas proteínas, puesto que el residuo Lys53 forma parte del área de unión al [sitio distal](#) del CIV ([Figura 4](#)) [70].

4.4 Glicación

La glicación de proteínas es un proceso espontáneo, no enzimático e irreversible por el que un grupo amino libre de la proteína (normalmente el extremo N-terminal o residuos de lisina o arginina) reacciona con un grupo carbonilo proveniente de un azúcar reductor u otros compuestos relacionados [75,76]. El principal agente intracelular responsable de la glicación de proteínas es el metilglioxal (MG), un subproducto de la glucólisis en células eucariotas [76]. En condiciones fisiológicas, el MG es degradado a D-lactato por el sistema glioxalasa [77]. En cambio, es frecuente encontrar niveles elevados de MG en pacientes con diabetes [78].

En un estudio en el que se sometió el Cc aislado de corazón equino (*Equus caballus*) a glicación *in vitro* mediante su exposición a MG se observó que el residuo Arg91 ([Figura 9B](#)) fue modificado por el mismo [76]. Como resultado, el Cc experimentó un desplegamiento parcial que resultó en una disminución considerable de su estabilidad conformacional [76]. En línea con esta observación, otros estudios han confirmado cambios en la estructura del Cc derivados de la glicación de la proteína [79]. La menor estabilidad del monómero de Cc se vio compensada con un incremento en estabilidad resultante de la agregación de los mismos [76]. Tal incremento en estabilidad del agregado proteico resultante puede deberse a una disminución del número de cadenas laterales hidrofóbicas expuestas al solvente [76]. La agregación de proteínas es un proceso que generalmente se correlaciona con una pérdida de función de las mismas [80], por lo que es de suponer que la glicación del Cc podría tener tal efecto sobre la proteína, impidiendo por tanto que lleve a cabo su papel como EC en la ETC ([Figura 1](#)).

Otro estudio describió la glicación de los residuos Lys72, Lys87 y Lys88 del Cc ([Figura 9B](#)) en el corazón de ternera [81]. Con el fin de estudiar la funcionalidad del Cc glicado en dichos residuos, sometieron la proteína a glicación mediante su reacción con la ribosa 5-fosfato (R5P), un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato. Observaron que la

glicación del Cc en los residuos indicados inhibió drásticamente su ET al CIV, siendo el efecto mayor a concentraciones crecientes de R5P [81]. Se estudió también la capacidad de asociación del Cc glicado a membranas (en forma de liposomas) con CL. En este sentido, descubrieron una disminución marcada en la afinidad del Cc por la CL como consecuencia de dicha PTM [81]. De esta forma, la glicación del Cc inhibiría su interacción con la CL [27]. [Además, teniendo en cuenta que la CL es la principal molécula con la que interactúa el Cc en condiciones fisiológicas](#) [47], dicha PTM podría tener un efecto negativo sobre la ET dependiente de Cc en la ETC [81]. Tal efecto se vería incrementado por la disminución en la capacidad del Cc glicado de reducir el CIV [81].

4.5 Sulfoxidación

Como PTM, la sulfoxidación consiste en la oxidación del grupo sulfuro de un residuo de metionina [27]. La aparición de esta PTM se ve favorecida por la presencia de OS [82]. Se ha descrito la sulfoxidación del Cc en el residuo Met80 en humanos ([Figura 9B](#)) [82]. No obstante, dicho residuo está presente en la gran mayoría de secuencias aminoacídicas de Cc eucariotas [25,83], por lo que su sulfoxidación y los efectos funcionales asociados podrían darse en otros organismos.

La sulfoxidación de Met80 provoca un cambio conformacional en el Cc por el que pierde el ambiente hidrofóbico propio del [bolsillo donde se aloja el HEC \(Figura 3B\)](#) [84]. Tal ambiente es necesario para el mantenimiento de un RP adecuado para que el Cc actúe como EC [84]. De hecho, se compararon los valores de RP del Cc WT y el Cc sulfoxidado en Met80 y se apreció una disminución de 76 mV en el valor de RP de la proteína sulfoxidada [84]. Tal disminución en el RP impediría al Cc actuar en la [OXPHOS](#), teniendo por tanto un efecto deletéreo sobre el metabolismo energético [27].

4.6 Homocisteinilación

La homocisteinilación del Cc consiste en la unión de residuos de homocisteína (HC) a los grupos amino de residuos de lisina mediante enlaces amida [27]. Esta PTM surge como consecuencia de niveles elevados de HC en sangre [85]. Tal situación es patológica (hiperhomocisteinemia) y guarda relación con enfermedades de tipo cardiovascular [85].

Se han descrito los residuos Lys8/Lys13, Lys86/Lys87, Lys99 y Lys100 del Cc ([Figura 9B](#)) aislado de corazón equino como susceptibles de ser afectados por esta PTM *in vitro* [86].

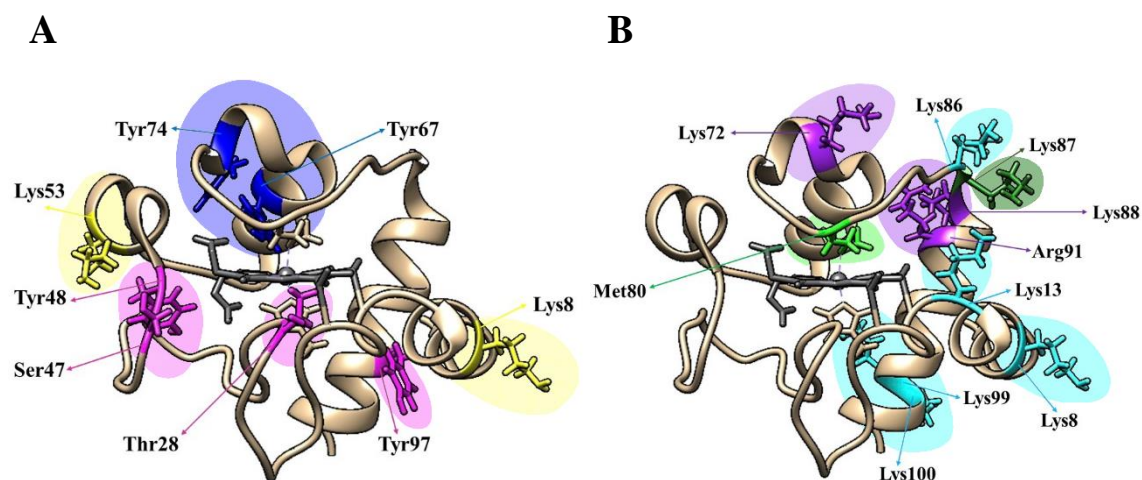


Figura 9. Estructura tridimensional del citocromo *c* (Cc) humano (PDB: 2N9I) señalando los residuos diana de modificaciones postraduccionales (PTMs) que regulan su funcionalidad en el metabolismo energético. El grupo hemo *c* (HEC) aparece coloreado en gris. Los diferentes residuos diana se indican en distintos colores dependiendo de la PTM que les afecte. Asimismo, se representan las cadenas laterales de los residuos afectados. **A)** Residuos susceptibles de ser modificados por fosforilación, nitración o acetilación. Los residuos fosforilables [55,57,58,61,62] se representan en magenta (Thr28, Ser47, Tyr48 y Tyr97), los nitrables [64] en azul (Tyr67 y Tyr74) y los acetilables [71,73] en amarillo (Lys8 y Lys53). El residuo fosforilable Thr58 no aparece representado puesto que dicha posición corresponde a un residuo de isoleucina en humanos. **B)** Residuos sujetos a glicación, sulfoxidación y homocisteinilación. Los residuos glicables [76,81] aparecen en morado (Lys72, Lys88 y Arg91), el residuo sulfoxidable Met80 [82] en verde y los homocisteinilables [86] en cian (Lys8/Lys13, Lys86, Lys99 y Lys100). El residuo Lys87 (en verde oscuro) puede ser modificado por glicación o por homocisteinilación [81,86]. Imágenes elaboradas en UCSF Chimera [6]. PDB: Protein Data Bank.

La homocisteinilación del Cc provoca cambios en la estructura secundaria del Cc, disminuyendo la fracción de hélices α [86]. Tales cambios exponen al solvente algunos grupos tiol [87]. La oxidación espontánea de los mismos da lugar al establecimiento de enlaces disulfuro intermoleculares, conduciendo a la multimerización de monómeros de Cc [87]. Esta situación conlleva un proceso de agregación [27] que podría abolir la funcionalidad del Cc [80], y por consiguiente, su papel crucial en la OXPHOS.

Por otra parte, dado que la homocisteinilación del Cc afecta a sus residuos de lisina [27,86], y que los mismos median las interacciones de la hemoproteína con CIII y CIV [11], se ha propuesto que esta PTM podría afectar al papel del Cc como EC en la ETC [27]. El efecto esperado sobre dicho papel sería negativo, pues la incorporación de HC a residuos de lisina disminuye la carga superficial positiva del Cc, al ser la HC menos básica que la lisina [27]. Dado que el Cc depende de su carga superficial positiva para llevar a cabo ETs en MSCs (al estar cargadas negativamente las superficies de CIII y CIV) [11], una carga superficial menos positiva podría comprometer dicha capacidad.

5 Conclusiones y perspectivas futuras

Como hemos podido apreciar, si bien el Cc es conocido principalmente por su función homeostática como EC en la ETC, no está limitado a dicha función. De hecho, juega un papel crucial en la ejecución de la apoptosis mediante la vía intrínseca y se ha sugerido en años recientes que podría estar involucrado asimismo en la DD. Además, se ha propuesto que el Cc podría estar implicado en la estabilidad estructural de diferentes MCs y, curiosamente, también en la de los MSCs. El rol del Cc en los MSCs podría no ser únicamente estructural, sino también funcional. Este último aspecto resulta particularmente interesante, pues el rol fisiológico de los MSCs es un asunto intensamente debatido en tiempos recientes.

La ET a larga distancia entre el Cc y los MCs CIII y CIV permite un mayor dinamismo en el proceso de ET en la ETC comparado con la ET entre proteínas redox mediante contacto físico. El hecho de que los mecanismos de ET entre el Cc y los MCs mencionados pueden involucrar o no interacciones físicas contrasta con la visión clásica de la ET interproteica, que únicamente contempla que dicho proceso tiene lugar mediante contactos físicos entre las proteínas interactoras. A su vez, el papel del Cc en el metabolismo energético se encuentra estrictamente regulado por diferentes PTMs, que alteran la estructura y, consecuentemente, la función de la hemoproteína.

Actualmente queda por dilucidar el papel del Cc en la estabilidad de los MCs y los MSCs. Asimismo, quedan por identificar las moléculas responsables de la mejora observada en el proceso de ET a larga distancia. Por otra parte, actualmente existen líneas de investigación que exploran la posibilidad de emplear el Cc modificado postraduccionalmente como posible terapia molecular de cara al tratamiento de diferentes patologías (como cáncer o enfermedades cardiovasculares) y sería muy interesante incentivarlas. En este sentido, una mejor comprensión sobre la funcionalidad del Cc modificado postraduccionalmente en el marco de dichas enfermedades podría ofrecer en un futuro terapias prometedoras de cara al tratamiento de las mismas.

6 Bibliografía

- Alshamsi, M., Hassane, M., Almarzooqi, F., & Souid, A. (2022). Cellular Respiration in Thymic Fragments from Mice. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 27(8).
- Wu, Z., He, K., Chen, Y., Li, H., Pan, S., Li, B., Liu, T., Xi, F., Deng, F., Wang, H., Du, J., Jing, M., & Li, Y. (2022). A sensitive GRAB sensor for detecting extracellular ATP in vitro and in vivo. *Neuron*, 110(5), 770–782.e5.
- Nelson, D., & Cox, M. (2019). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Omega.
- Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. Spandidos Publications.
- Adapted from “Mitochondria Membrane (Layout)”, by BioRender.com (2023). Retrieved from <https://app.biorender.com/biorender-templates>
- Petersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., & Ferrin, T. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
- Liu, J., Chakraborty, S., Hosseinzadeh, P., Yu, Y., Tian, S., Petrik, I., Bhagi, A., & Lu, Y. (2014). Metalloproteins containing cytochrome, iron-sulfur, or copper redox centers. *Chemical Reviews*. American Chemical Society.
- Alvarez-Paggi, D., Hannibal, L., Castro, M., Oviedo-Rouco, S., Demicheli, V., Tórtora, V., Tomasina, F., Radi, R., & Murgida, D. (2017). Multifunctional Cytochrome c: Learning New Tricks from an Old Dog. *Chemical Reviews*, 117(21), 13382–13460.
- Layer, G. (2021). Heme biosynthesis in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V.
- González-Arzola, K., Velázquez-Cruz, A., Guerra-Castellano, A., Casado-Combreras, M., Pérez-Mejías, G., Díaz-Quintana, A., Díaz-Moreno, I., & De la Rosa, M. (2019). New moonlighting functions of mitochondrial cytochrome *c* in the cytoplasm and nucleus. *FEBS Letters*. Wiley Blackwell.
- Pérez-Mejías, G., Díaz-Quintana, A., Guerra-Castellano, A., Díaz-Moreno, I., & De la Rosa, M. (2022). Novel insights into the mechanism of electron transfer in mitochondrial cytochrome *c*. *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier B.V.
- González-Arzola, K., Moreno-Beltrán, B., Martínez-Fábregas, J., De la Rosa, M., & Díaz-Moreno, I. (2016). Cytochrome *c*-Based Signalosome. En Louro, R., & Díaz-Moreno, I. (Eds.), *Redox Proteins in Supercomplexes and Signalosomes* (275-298). CRC Press.
- Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Fendler, K., & Michel, H. (2002). Reduction of cytochrome *c* oxidase by a second electron leads to proton translocation. *Nature*, 417(6884), 99–102.
- Li, K., Li, Y., Shelton, J., Richardson, J., Spencer, E., Chen, Z., Wang, X., & Williams, R. (2000). Cytochrome *c* deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*, 101(4), 389–399.
- Ghelli, A., Tropeano, V., & Rugolo, M. (2016). Mitochondrial Respiratory Supercomplexes in Physiology and Diseases. En Louro, R., & Díaz-Moreno, I. (Eds.), *Redox Proteins in Supercomplexes and Signalosomes* (149-165). CRC Press.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F., Zhou, T., Liu, B., & Bao, J. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487–498.
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*. Springer Science and Business Media B.V.
- Nössing, C., & Ryan, K. (2023). 50 years on and still very much alive: ‘Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.’ *British Journal of Cancer*, 128(3), 426–431.
- Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. (2019). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and

- therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd.
20. González-Arzola, K., Díaz-Quintana, A., Bernardo-García, N., Martínez-Fábregas, J., Rivero-Rodríguez, F., Casado-Combreras, M., Elena-Real, C., Velázquez-Cruz, A., Gil-Caballero, S., Velázquez-Campoy, A., Szulc, E., Gavilán, M., Ayala, I., Arranz, R., Ríos, R., Salvatella, X., Valpuesta, J., Hermoso, J., De la Rosa, M., & Díaz-Moreno, I. (2022). Nucleus-translocated mitochondrial cytochrome c liberates nucleophosmin-sequestered ARF tumor suppressor by changing nucleolar liquid-liquid phase separation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 29(10), 1024–1036.
 21. Martínez-Fábregas, J., Díaz-Moreno, I., González-Arzola, K., Díaz-Quintana, A., & De la Rosa, M. (2014). A common signalosome for programmed cell death in humans and plants. *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group.
 22. Díaz-Moreno, I., Velázquez-Cruz, A., Curran-French, S., Díaz-Quintana, A., & De la Rosa, M. (2018). Nuclear cytochrome c – a mitochondrial visitor regulating damaged chromatin dynamics. *FEBS Letters*, 592(2), 172–178.
 23. González-Arzola, K., Díaz-Moreno, I., Cano-González, A., Díaz-Quintana, A., Velázquez-Campoy, A., Moreno-Beltrán, B., López-Rivas, A., De la Rosa, M., & Fersht, A. (2015). Structural basis for inhibition of the histone chaperone activity of SET/TAF-1 β by cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(32), 9908–9913.
 24. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F., De Beer, T., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303.
 25. Zaidi, S., Hassan, M., Islam, A., & Ahmad, F. (2014). The role of key residues in structure, function, and stability of cytochrome-c. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
 26. Díaz-Moreno, I., García-Heredia, J., Díaz-Quintana, A., & De la Rosa, M. (2011). Cytochrome c signalosome in mitochondria. *European Biophysics Journal*, 40(12), 1301–1315.
 27. Guerra-Castellano, A., Márquez, I., Pérez-Mejías, G., Díaz-Quintana, A., De la Rosa, M., & Díaz-Moreno, I. (2020). Post-translational modifications of cytochrome c in cell life and disease. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG.
 28. Imai, M., Saio, T., Kumeta, H., Uchida, T., Inagaki, F., & Ishimori, K. (2016). Investigation of the redox-dependent modulation of structure and dynamics in human cytochrome c. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(4), 978–984.
 29. Richardson, J. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advances in Protein Chemistry*, 34(C), 167–339.
 30. Kyte, J., & Doolittle, R. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132.
 31. Pérez-Mejías, G., Guerra-Castellano, A., Díaz-Quintana, A., De la Rosa, M., & Díaz-Moreno, I. (2019). Cytochrome c: Surfing Off of the Mitochondrial Membrane on the Tops of Complexes III and IV. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Elsevier B.V.
 32. Porras, C., & Bai, Y. (2015). Respiratory supercomplexes: Plasticity and implications. *Frontiers in Bioscience - Landmark*. Frontiers in Bioscience.
 33. Acin-Perez, R., & Enriquez, J. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*
 34. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*.
 35. Lagunas, A., Guerra-Castellano, A., Nin-Hill, A., Díaz-Moreno, I., De la Rosa, M., Samitier, J., Rovira, C., & Gorostiza, P. (2018). Long distance electron transfer through the aqueous solution between redox partner proteins. *Nature communications*, 9(5157), 2.
 36. Melin, F., & Hellwig, P. (2020). Redox Properties of the Membrane Proteins from the

- Respiratory Chain. *Chemical Reviews*. American Chemical Society.
37. Winkler, J., & Gray, H. (2014). Long-range electron tunneling. *Journal of the American Chemical Society*.
 38. Shimada, S., Shinzawa-Itoh, K., Baba, J., Aoe, S., Shimada, A., Yamashita, E., Kang, J., Tateno, M., Yoshikawa, S., & Tsukihara, T. (2017). Complex structure of cytochrome c – cytochrome c oxidase reveals a novel protein–protein interaction mode. *The EMBO Journal*, 36(3), 291–300.
 39. Pérez-Mejías, G., Olloqui-Sariego, J., Guerra-Castellano, A., Díaz-Quintana, A., Calvente, J., Andreu, R., De la Rosa, M., & Díaz-Moreno, I. (2020). Physical contact between cytochrome c₁ and cytochrome c increases the driving force for electron transfer. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, 1861(12), 148277.
 40. Guerra-Castellano, A., Díaz-Moreno, I., Velázquez-Campoy, A., De la Rosa, M., & Díaz-Quintana, A. (2016). Structural and functional characterization of phosphomimetic mutants of cytochrome c at threonine 28 and serine 47. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(4), 387–395.
 41. Vempati, U., Han, X., & Moraes, C. (2009). Lack of cytochrome c in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4383–4391.
 42. Li, Y., D'Aurelio, M., Deng, J., Park, J., Manfredi, G., Hu, P., Lu, J., & Bai, Y. (2007). An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17557–17562.
 43. Created with BioRender.com.
 44. Barrientos, A., Pierre, D., Lee, J., & Tzagoloff, A. (2003). Cytochrome oxidase assembly does not require catalytically active cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 8881–8887.
 45. Welchen, E., Hildebrandt, T., Lewejohann, D., Gonzalez, D., & Braun, H. (2012). Lack of cytochrome c in Arabidopsis decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes i and III. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(7), 990–1001.
 46. Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, 32(4), 529–539.
 47. Ascenzi, P., Coletta, M., Wilson, M., Fiorucci, L., Marino, M., Polticelli, F., Sinibaldi, F. & Santucci, R. (2015). Cardiolipin-cytochrome c complex: Switching cytochrome c from an electron-transfer shuttle to a myoglobin- and a peroxidase-like heme-protein. *IUBMB Life*. Blackwell Publishing Ltd.
 48. McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D., & Ryan, M. (2006). Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Are Destabilized in Barth Syndrome Patients. *Journal of Molecular Biology*, 361(3), 462–469.
 49. Berndtsson, J., Kohler, A., Rathore, S., Marin-Buera, L., Dawitz, H., Diessl, J., Kohler, V., Barrientos, A., Büttner, S., Fontanesi, F., & Ott, M. (2020). Respiratory supercomplexes enhance electron transport by decreasing cytochrome c diffusion distance. *EMBO reports*, 21(12), e51015.
 50. Enríquez, J. (2016). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annual Review of Physiology*. Annual Reviews Inc.
 51. Farmer, T., Naslavsky, N., & Caplan, S. (2018). Tying trafficking to fusion and fission at the mighty mitochondria. *Traffic*. Blackwell Munksgaard.
 52. Karve, T., & Cheema, A. (2011). Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *Journal of amino acids*, 2011, 207691.
 53. Kalpage, H., Bazylanska, V., Recanati, M., Fite, A., Liu, J., Wan, J., Mantena, N., Malek, M., Podgorski, I., Heath, E., Vaishnav, A., Edwards, B., Grossman, L., Sanderson, T., Lee, I., & Hüttemann, M. (2019). Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American*

- Societies for Experimental Biology*, 33(2), 1540–1553.
54. Kalpage, H., Wan, J., Morse, P., Zurek, M., Turner, A., Khobeir, A., Yazdi, N., Hakim, L., Liu, J., Vaishnav, A., Sanderson, T., Recanati, M., Grossman, L., Lee, I., Edwards, B., & Hüttemann, M. (2020). Cytochrome c phosphorylation: Control of mitochondrial electron transport chain flux and apoptosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 121, 105704.
 55. Mahapatra, G., Varughese, A., Ji, Q., Lee, I., Liu, J., Vaishnav, A., Sinkler, C., Kapralov, A., Moraes, C., Sanderson, T., Stemmler, T., Grossman, L., Kagan, V., Brunzelle, J., Salomon, A., Edwards, B., & Hüttemann, M. (2017). Phosphorylation of Cytochrome c Threonine 28 Regulates Electron Transport Chain Activity in Kidney: IMPLICATIONS FOR AMP KINASE. *The Journal of biological chemistry*, 292(1), 64–79.
 56. Kobayashi, A., Azuma, K., Takeiwa, T., Kitami, T., Horie, K., Ikeda, K., & Inoue, S. (2023). A FRET-based respirasome assembly screen identifies spleen tyrosine kinase as a target to improve muscle mitochondrial respiration and exercise performance in mice. *Nature Communications*, 14(1).
 57. Kalpage, H., Vaishnav, A., Liu, J., Varughese, A., Wan, J., Turner, A., Ji, Q., Zurek, M., Kapralov, A., Kagan, V., Brunzelle, J., Recanati, M., Grossman, L., Sanderson, T., Lee, I., Salomon, A., Edwards, B., & Hüttemann, M. (2019). Serine-47 phosphorylation of cytochrome c in the mammalian brain regulates cytochrome c oxidase and caspase-3 activity. *FASEB Journal*, 33(12), 13503–13514.
 58. Yu, H., Lee, I., Salomon, A., Yu, K., & Hüttemann, M. (2008). Mammalian liver cytochrome c is tyrosine-48 phosphorylated in vivo, inhibiting mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1777(7–8), 1066–1071.
 59. Pecina, P., Borisenko, G., Belikova, N., Tyurina, Y., Pecinova, A., Lee, I., Samham-Arias, A., Przyklenk, K., Kagan, V., & Hüttemann, M. (2010). Phosphomimetic substitution of cytochrome c tyrosine 48 decreases respiration and binding to cardiolipin and abolishes ability to trigger downstream caspase activation. *Biochemistry*, 49(31), 6705–6714.
 60. Moreno-Beltrán, B., Guerra-Castellano, A., Díaz-Quintana, A., Conte, R., García-Mauriño, S., Díaz-Moreno, S., González-Arzola, K., Santos-Ocaña, C., Velázquez-Campoy, A., De la Rosa, M., Turano, P., & Díaz-Moreno, I. (2017). Structural basis of mitochondrial dysfunction in response to cytochrome c phosphorylation at tyrosine 48. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(15), E3041–E3050.
 61. Wan, J., Kalpage, H., Vaishnav, A., Liu, J., Lee, I., Mahapatra, G., Turner, A., Zurek, M., Ji, Q., Moraes, C., Recanati, M., Grossman, L., Salomon, A., Edwards, B., & Hüttemann, M. (2019). Regulation of Respiration and Apoptosis by Cytochrome c Threonine 58 Phosphorylation. *Scientific reports*, 9(1), 15815.
 62. Sanderson, T., Mahapatra, G., Pecina, P., Ji, Q., Yu, K., Sinkler, C., Varughese, A., Kumar, R., Bukowski, M., Tousignant, R., Salomon, A., Lee, I., & Hüttemann, M. (2013). Cytochrome C is tyrosine 97 phosphorylated by neuroprotective insulin treatment. *PLoS one*, 8(11), e78627.
 63. Guerra-Castellano, A., Díaz-Quintana, A., Pérez-Mejías, G., Elena-Real, C., González-Arzola, K., García-Mauriño, S., De la Rosa, M., & Díaz-Moreno, I. (2018). Oxidative stress is tightly regulated by cytochrome c phosphorylation and respirasome factors in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(31), 7955–7960.
 64. Rodríguez-Roldán, V., García-Heredia, J., Navarro, J., De la Rosa, M., & Hervás, M. (2008). Effect of nitration on the physicochemical and kinetic features of wild-type and monotyrosine mutants of human respiratory cytochrome c. *Biochemistry*, 47(47), 12371–12379.
 65. MacMillan-Crow, L., Cruthirds, D., Ahki, K., Sanders, P., & Thompson, J. (2001). Mitochondrial tyrosine nitration precedes

- chronic allograft nephropathy. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(12), 1603–1608.
66. Nakagawa, H., Ohshima, Y., Takusagawa, M., Ikota, N., Takahashi, Y., Shimizu, S., & Ozawa, T. (2001). Functional modification of cytochrome c by peroxynitrite in an electron transfer reaction. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49(12), 1547–1554.
 67. Reinehr, R., Görg, B., Höngen, A., & Häussinger, D. (2004). CD95-tyrosine Nitration Inhibits Hyperosmotic and CD95 Ligand-induced CD95 Activation in Rat Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 10364–10373.
 68. Hosp, F., Lassowskat, I., Santoro, V., De Vleeschauwer, D., Fliegner, D., Redestig, H., Mann, M., Christian, S., Hannah, M., & Finkemeier, I. (2017). Lysine acetylation in mitochondria: From inventory to function. *Mitochondrion*, 33, 58–71.
 69. Wada, K., & Okunuki, K. (1968). Studies on chemically modified cytochrome c. The acetylated cytochrome c. *Journal of Biochemistry*, 64(5), 667–687.
 70. Márquez, I., Pérez-Mejías, G., Guerra-Castellano, A., Olloqui-Sariego, J., Andreu, R., Calvente, J., De la Rosa, M., & Díaz-Moreno, I. (2021). Structural and functional insights into lysine acetylation of cytochrome c using mimetic point mutants. *FEBS Open Bio*, 11(12), 3304–3323.
 71. Kim, S., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N., White, M., Yang, X., & Zhao, Y. (2006). Substrate and Functional Diversity of Lysine Acetylation Revealed by a Proteomics Survey. *Molecular Cell*, 23(4), 607–618.
 72. Moreno-Beltrán, B., Díaz-Moreno, I., González-Arzola, K., Guerra-Castellano, A., Velázquez-Campoy, A., De la Rosa, M., & Díaz-Quintana, A. (2015). Respiratory complexes III and IV can each bind two molecules of cytochrome c at low ionic strength. *FEBS Letters*, 589(4), 476–483.
 73. Bazylianska, V., Kalpage, H., Wan, J., Vaishnav, A., Mahapatra, G., Turner, A., Chowdhury, D., Kim, K., Morse, P., Lee, I., Brunzelle, J., Polin, L., Subedi, P., Heath, E., Podgorski, I., Marcus, K., Edwards, B., & Hüttemann, M. (2021). Lysine 53 acetylation of cytochrome c in prostate cancer: Warburg metabolism and evasion of apoptosis. *Cells*, 10(4).
 74. Lu, J., Tan, M., & Cai, Q. (2015). The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd.
 75. Sirangelo, I., & Iannuzzi, C. (2021). Understanding the role of protein glycation in the amyloid aggregation process. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI.
 76. Oliveira, L., Gomes, R., Yang, D., Dennison, S., Família, C., Lages, A., Coelho, A., Murphy, R., Phoenix, D., & Quintas, A. (2013). Insights into the molecular mechanism of protein native-like aggregation upon glycation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1834(6), 1010–1022.
 77. Chakraborty, S., Karmakar, K., & Chakravorty, D. (2014). Cells producing their own nemesis: Understanding methylglyoxal metabolism. *IUBMB Life*, 66(10), 667–678.
 78. Shamsaldeen, Y., Mackenzie, L., Lione, L., & Benham, C. (2016). Methylglyoxal, A Metabolite Increased in Diabetes is Associated with Insulin Resistance, Vascular Dysfunction and Neuropathies. *Current drug metabolism*, 17(4), 359–367.
 79. Mercado-Urbe, H., Andrade-Medina, M., Espinoza-Rodríguez, J., Carrillo-Tripp, M., & Scheckhuber, C. (2020). Analyzing structural alterations of mitochondrial intermembrane space superoxide scavengers cytochrome-c and SOD1 after methylglyoxal treatment. *PLoS ONE*, 15(4).
 80. Fassler, J., Skuodas, S., Weeks, D., & Phillips, B. (2021). Protein Aggregation and Disaggregation in Cells and Development: Functional aggregation in cells and development. *Journal of Molecular Biology*. Academic Press.
 81. Hildick-Smith, G., Downey, M., Gretebeck, L., Gersten, R., & Sandwick, R. (2011). Ribose 5-phosphate glycation reduces cytochrome c respiratory activity and membrane affinity. *Biochemistry*, 50(51), 11047–11057.
 82. Wang, Z., Ando, Y., Nugraheni, A., Ren, C., Nagao, S., & Hirota, S. (2014). Self-oxidation

- of cytochrome c at methionine80 with molecular oxygen induced by cleavage of the Met-heme iron bond. *Molecular BioSystems*, 10(12), 3130–3137.
83. Banci, L., Bertini, I., Rosato, A., & Varani, G. (1999). Mitochondrial cytochromes c: A comparative analysis. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 4(6), 824–837.
84. Ivanetich, K., Bradshaw, J., & Kaminsky, L. (1976). Methionine Sulfoxide Cytochrome c. *Biochemistry*, 15(5), 1144–1153.
85. Gates, A., Moore, L., Sylvain, M., Jones, C., Lowry, M., El-Zahab, B., Robinson, J., Strongin, R., & Warner, I. (2009). Mechanistic Investigation of N-Homocysteinylation-mediated protein-Gold nanoconjugate assembly. *Langmuir*, 25(16), 9346–9351.
86. Perla-Kaján, J., Marczak, L., Kaján, L., Skowronek, P., Twardowski, T., & Jakubowski, H. (2007). Modification by homocysteine thiolactone affects redox status of cytochrome c. *Biochemistry*, 46(21), 6225–6231.
87. Jakubowski, H. (1999). Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *The FASEB Journal*, 13(15), 2277–2283.