



# Regulación de la dinámica mitocondrial en neuronas sometidas a excitotoxicidad

Alejandro Martorell Riera

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.

# **Regulación de la dinámica mitocondrial en neuronas sometidas a excitotoxicidad**

**Alejandro Martorell Riera**

**Barcelona, Octubre 2014**

---



## **Universidad de Barcelona**

### **Departamento de Biología Celular**

Memoria presentada por el licenciado en Biología Alejandro Martorell Riera, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona, por el programa de Doctorado en Biomedicina del Departamento de Biología Celular (2011 – 2014).

La presente Tesis Doctoral: “Regulación de la dinámica mitocondrial en neuronas sometidas a excitotoxicidad” ha estado realizada en el Grupo Celltec-UB del Departamento de Biología Celular bajo la dirección del Dr. Francesc X. Soriano Zaragoza y tutorizada por el Dr. Manuel Reina del Pozo.

El Director,

El Tutor,

El Doctorando

Francesc X. Soriano

Manuel Reina

Alejandro Martorell

---

---

# RESUMEN

---

---

Durante el ictus, los niveles elevados de glutamato extracelular, el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central, aumentan y se unen al receptor de NMDA promoviendo la excitotoxicidad. Esta situación genera que un flujo excesivo de  $\text{Ca}^{2+}$  pase a través del receptor de NMDA aumentando sus concentraciones intracelulares activando toda una serie de cascadas de señalización que pueden actuar directamente sobre las mitocondrias, promoviendo varios programas de muerte celular.

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos que constantemente se fusionan y dividen, cambiando de forma y localización. El equilibrio entre la fisión y la fusión es importante para la función mitocondrial y es un regulador clave de la progresión de la muerte celular. Las proteínas que conforman el proceso de fusión mitocondrial y de fisión están formadas por un grupo de GTPasas. La fusión de la membrana mitocondrial interna está mediada por OPA1. Dos mitofusinas (Mfn1 y 2) median la fusión de la membrana externa mitocondrial. Por otro lado, la fisión mitocondrial está mediada por Drp1, una proteína citoplasmática que es reclutada a la superficie mitocondrial después de ser modificada a nivel post-traducciona. Los problemas relacionados con la dinámica mitocondrial se han descrito en múltiples enfermedades neurodegenerativas así como también en cáncer y sida.

En esta Tesis hemos demostrado que Mfn2 juega un papel muy importante en el mantenimiento de la funcionalidad mitocondrial y la supervivencia neuronal. En excitotoxicidad es la única proteína de la maquinaria de fusión/fisión que disminuye su expresión en dos modelos *in vitro* distintos y también en un modelo *in vivo*. Hemos identificado dos fases de fragmentación mitocondrial en excitotoxicidad. La primera y que cursa en poco tiempo depende de la activación y reclutamiento de Drp1 mientras que la fase tardana que se inicia 4 horas después del insulto, parece depender de la reducción de los niveles proteicos de Mfn2. Esta fase tardía es irreversible y parece condenar a la neurona. La disminución de Mfn2 genera alteraciones en la homeóstasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , disminuye el potencial de membrana mitocondrial, empeora la comunicación entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático, aumenta la traslocación de Bax a las mitocondrias y favorece la liberación del citocromo c.

Hemos encontrado que la reducción en la expresión de Mfn2 durante la excitotoxicidad se da a nivel transcripcional y depende del factor de transcripción MEF2 que regula a Mfn2 a nivel basal en neuronas. En excitotoxicidad, MEF2 es degradado y causa la disminución de Mfn2. Este contexto hace pensar que Mfn2 podría ser una diana a tener en cuenta para futuros desarrollos de drogas y poder, de este modo, incrementar la pequeña ventana terapéutica que existe actualmente para el ictus.

---

---

## AGRADECIMIENTOS

---

---

Definir el término ‘Ciencia’ y entender, no solo su significado, sino también su entidad, es una labor ardua en la que llevan trabajando muchos eruditos, pensadores, filósofos, alquimistas y científicos desde los inicios de nuestros tiempos hasta el día de hoy. Recorrer la historia hasta nuestra antigüedad con el propósito de lograr encontrar ese vacío es una tarea también peliaguda. La ciencia parece no tener un principio definido. Si nos centramos en que el origen reside en Newton y la publicación de sus tan importantes obras a finales del s. XVII, nos estaríamos olvidando de grandes personalidades. Por ello, quizás sería más efectivo centrarse en Copérnico cuando sugirió, en 1543, que es el Sol, y no la Tierra, es el que ocupa el centro de nuestro sistema planetario. En este caso no nombraríamos a los científicos árabes que tanto han influido en el conocimiento occidental como Avicena, Averroes y Alhacén. Pero si miramos más atrás veríamos que seguimos sin tener en cuenta unas culturas tan importantes como Babilonia, Egipto y Grecia, ya que sus influencias han permanecido vivas hasta bien entrado el s. XVIII.

Por tanto, hablar y escribir de ciencia no es tan fácil como parece. La mezcla de opiniones es el mejor método para comprender y hacer que las cosas parezcan más sencillas. Aquí reside la importancia de los congresos científicos donde expertos de todo el mundo intercambian opiniones e impresiones cual niños en un parque. De estos contactos nacen colaboraciones y florecen ideas aplicables. Pero no hay que olvidar que la labor del científico no está bien definida ni comprendida por el colectivo. A la sociedad, lo que le interesa realmente es saber en qué plazos se están consiguiendo éxitos y avances significativos. Una noticia en el periódico que pronostica una nueva posible terapia contra alguna enfermedad o la descripción de una nueva proteína vinculada a alguna patología, despiertan rápidamente la atención del lector. Es relativamente sencillo crear expectación y los medios son expertos en esto. La realidad es algo más distorsionada. Desde la noticia en los medios a la probabilidad de obtener algo hay un abismo entremedio lleno de desafíos donde el porcentaje de éxito es extremadamente bajo y el camino está lleno de peajes millonarios y burocracia infinita. Es difícil comprender que el trabajo de laboratorio es complicado, de larga duración y muy caro. Obtener resultados en poco tiempo no es posible, por ello es imprescindible la participación de grupos y centros de investigación en todo el mundo.

El método, como tal, fue descrito por Descartes en 1637 y lo origina en la lógica, el análisis y el álgebra. Son principios esenciales, perfectamente adaptables a la ciencia. Sin ir más lejos, el método científico, definido como la teoría de los resultados experimentales, se considera que nació con Galileo Galilei ya que fue de los primeros en diseñar experimentos a escala humana para intentar explicar a los demás lo que observaba y descubría. Desde entonces, la necesidad de nuevos y mejorados métodos de trabajo en el laboratorio ha sido fundamental para los avances realizados.

En primer lugar me gustaría agradecer a la Ciencia por existir, por formar parte de nosotros, por rodearnos, por formarnos, por aparecer en los momentos que menos esperamos y, por supuesto, por ser tan interesante y mágica. Gracias a ti muchos ilusionados encontramos nuestra vocación y, porque no, nuestro trabajo. Nos esforzamos en intentar comprenderte, en conocerte, en desgranarte en mil pedazos para analizar tus entrañas y saber qué es lo que nos rodea y nos forma. Como verás, esta Tesis es mi aportación, mi granito de arena a la inmensidad de información que te forman. Espero haber cumplido mi cometido y que, realmente, mi trabajo haya servido para engordar el conocimiento general.

---

Dentro de la Ciencia englobo también a las mitocondrias. Gracias a vosotras también por estar aquí, dentro de todas nuestras células. Tengo que confesarme porque, a decir verdad, me habéis enamorado. He leído mucho sobre vosotras, tal como queda plasmado en esta Tesis, y me seguís deslumbrando día a día. Sois un gran ejemplo para enseñar Ciencia tanto a los pequeños como a los mayores. Estáis tan incluidas en nuestras células eucariotas que sin vosotras no podríamos vivir. Trabajar y comprenderos ha sido un camino arduo e intenso. He descubierto muchas cosas relacionadas con vosotras y he tenido la oportunidad de investigaros para conocer mejor vuestro dinamismo, como os comunicáis con otros orgánulos y la relevancia de la proteína Mfn2 en todo esto.

Mi más sincero agradecimiento es para mí director de Tesis, el Dr. Francesc X. Soriano por creer en mí cuando todo eran complicaciones para conseguir iniciar el doctorado, por enseñarme y transmitirme casi todo lo que he aprendido en el laboratorio, por conseguir plasmar el trabajo realizado con nuestras manos en un artículo de tanta relevancia y, cómo no, por todo el tiempo que has depositado en mí durante estos tres años y medio. Me has hecho crecer como investigador y lo he podido hacer en un proyecto de gran interés que abre muchas posibilidades para el futuro.

También quiero agradecer a mi tutor de Tesis, el Dr. Manuel Reina. Gracias a tu infraestructura, tu diligencia, tu dedicación y profesionalidad, me has ayudado a seguir adelante, con esfuerzo y sin vacilar. Siempre agradeceré las veces que he podido entrar en tu despacho para comentarte dudas e inquietudes y tú, amablemente, me has respondido.

A todos mis amigos del laboratorio con parejas incluidas: Xavi, María, Claudia, Carlos, Victor, Núria, Marc y Janat. Gracias a vosotros estos tres años y medio se han convertido en un parque de atracciones. Demasiadas experiencias buenas me llevó a mi nuevo destino, difícilmente se podrán mejorar. Espero mantener el contacto con todos y cada uno de vosotros. No cambiéis, sed los que sois, os recordaré siempre. También a los expertos Ricardo, Enric, Ofelia y Conxita por todos los consejos y dudas solucionadas.

A Manel Bosch, del servicio de microscopía confocal, por asesorarme y ayudarme en todos los experimentos que hemos estado elaborando para esta Tesis.

Otro agradecimiento es, por supuesto, para la fantástica e ilustre científica Lynn Margulis, fallecida en 2011. Todavía recuerdo su conferencia que escuché en la Universidad Autónoma de Barcelona cuando la nombraron doctora honoris causa. Sus palabras calaron en mí, igual que su teoría de la endosimbiosis para explicar el origen de nuestras mitocondrias. Quién se iba a imaginar que varios años después estaría yo realizando mi Tesis en el estudio de las mitocondrias en un contexto de ictus, justamente la desgraciada patología que te apartó de este mundo. Parte de mi dedicación y pasión a la Ciencia se la debo justamente a personas tan especiales como a ti, gracias.

A Ismaïl y Daphne por todos los fantásticos momentos que hemos pasado juntos y los que nos esperan todavía. Por todo lo que nos habéis enseñado y todo lo que nos habéis dado. Gracias por vuestra compañía y ayudarme a creer en la Fuerza y el Honor.

La familia, cómo no mencionarlos. Mamá, papá y Víctor; gracias por vuestro apoyo, gracias por vuestro tiempo, por escucharme y aconsejarme tantas y tantas veces, por siempre estar cuando se os necesita y por alegraros tanto con mis progresos. Me voy lejos, pero dentro de mi corazón

---

siempre llevaré vuestras sonrisas, vuestros abrazos y besos, vuestras personalidades y vuestro calor interno. Voy a crecer y mejorar, tanto profesional como personalmente. Siempre vais a estar conmigo para seguir viviendo nuestro día a día. Os quiero.

Carlota, para ti va dedicada esta Tesis. Los últimos meses han sido complicados, demasiado estrés acumulado por distintos motivos pero tú, siempre has estado a mi lado, siempre me has aconsejado, siempre has escuchado cuando tenía que explicar o desfogarme, siempre me has dado tu cariño y amor y siempre he podido tenerte a mi lado, para lo bueno y lo malo. Mil gracias por ser tan fantástica, tan divertida, tan especial, tan abierta, tan peculiar y tan inteligente. Gran parte del esfuerzo para seguir adelante te lo debo a ti, por actuar como soporte emocional en repetidas ocasiones. Como he dicho antes, trabajar en Ciencia es una labor ardua. Me complace saber que sabes quién es Mfn2 y qué son las mitocondrias, por contrapartida, yo he aprendido sobre Coco Chanel y Vogue. Nos esperan muchas aventuras juntos, hay que aprovechar el tiempo. Te quiero.

---

---

---

---

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

Resumen	7
Agradecimientos	11
Abreviaturas	25
Índice de Figuras	29
Índice de Tablas	33
Índice de <i>Boxes</i>	37
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>41</b>
<b>EL ICTUS Y LA EXCITOTOXICIDAD</b>	<b>41</b>
Ictus o infarto cerebrovascular	41
El receptor NMDA (NMDAR)	43
El proceso excitotóxico y las vías de señalización del Ca <sup>2+</sup>	45
Excitotoxicidad y las enfermedades neurodegenerativas asociadas	47
<b>LA DINÁMICA MITOCONDRIAL</b>	<b>48</b>
Introducción a las mitocondrias	48
Estructura, composición y funciones de las mitocondrias	49
Proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial	54
<i>Mfn1 y 2</i>	55
<i>Opa1</i>	63
<i>Drp1</i>	64
<i>Fis1 / Mff / MIEF1 o MiD51 &amp; MiD49</i>	66
Mecanismo de fusión y fisión	69
<i>Fisión independiente de Drp1</i>	73
Comunicación entre orgánulos	74
<i>Unión con el retículo endoplasmático</i>	74
<i>Desplazamiento de mitocondrias</i>	77
<i>Peroxisomas/Lisosomas y formación de MDVs</i>	79
La dinámica mitocondrial y las enfermedades neurodegenerativas	82
<i>Principales enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer, Parkinson y Huntington</i>	82
<b>APOPTOSIS</b>	<b>86</b>
Proteínas involucradas en el proceso de apoptosis	86
Mecanismo de apoptosis	86
Mecanismo de necroptosis	90
<b>AUTOFAGIA</b>	<b>92</b>
Introducción	92
Mecanismo de autofagia y proteínas involucradas	92
Autofagia y enfermedades neurodegenerativas	95
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>99</b>
1. Modelos animales	99
1.1 Modelo de isquemia focal	99
1.2 Cruces y ratones utilizados	99

---

1.3 Genotipación	99
1.4 Tratamiento <i>in vivo</i> con NMDA	100
1.5 Extracción de proteína del músculo	102
1.6 Marcaje por inmunohistoquímica	103
1.7 Marcaje por inmunofluorescencia con Fluoro-Jade C	103
2. Cultivos primarios de neuronas corticales de rata	104
2.1 Condiciones generales	104
2.2 Medios y reactivos generales	105
2.3 Preparación del <i>coating</i>	105
2.4 Preparación de la solución de disección	106
2.5 Preparación de la solución de papaína	107
2.6 Extracción de las cortezas cerebrales de rata	107
3. Cultivos celulares	110
3.1 Condiciones generales	110
3.2 Línea celular utilizada	110
3.3 Medios y reactivos generales	111
3.4 Técnicas generales	111
4. Técnicas generales de manipulación del DNA	113
4.1 Bacterias competentes.	113
4.1.1 Transformación	113
4.2 Recuperación del DNA	114
4.2.1 Miniprep	114
4.2.2 Midiprep y Maxiprep	114
4.3 Análisis del DNA por restricción	114
4.4 Electroforesis en gel de agarosa	114
4.5 Recuperación de fragmentos de DNA (de geles de agarosa)	116
4.6 Clonación	116
4.6.1 Clonaje de productos de PCR	116
4.7 Ligación	117
4.8 PCR	118
4.9 Mutagénesis dirigida	119
4.10 Secuenciación	120
5. Transfección celular transitoria	121
5.1 Plásmidos utilizados	121
5.2 Transfección con el reactivo comercial <i>Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000</i>	121
6. Valoración de proteínas	123
7. Western Blot	123
7.1 Electroforesis SDS-PAGE	123
7.2 Transferencia de proteínas.	125
7.3 Ensayo de inmunodetección	125
8. Obtención de proteínas mitocondriales (aislamiento mitocondrial) y citoplasmáticas	127
9. Co-inmunoprecipitación	128
10. RT-PCR	130
10.1 Extracción de RNA	130
10.2 Síntesis de cDNA	130
10.3 Reacción de RT-qPCR	131
11. Ensayos de fluorimetría	132
11.1 Reactivos, soluciones e instrumentos generales	132

11.2 Determinación del Ca <sup>2+</sup> intracelular	132
11.3 Determinación de los niveles de ATP	133
11.4 Determinación de los niveles de NAD <sup>+</sup> /NADH	133
12. Microscopía de fluorescencia y confocal	134
12.1 Microscopio de fluorescencia	135
12.2 Microscopio confocal	136
12.3 Fijación de las muestras con paraformaldehído	137
12.4 Análisis de la morfología mitocondrial	138
12.5 Marcaje por inmunofluorescencia	138
12.6 Determinación de la muerte celular	140
12.7 Determinación del Ca <sup>2+</sup> citoplasmático y mitocondrial por microscopía confocal	140
12.8 Medida del potencial de membrana mitocondrial	141
12.9 Análisis de la colocalización entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias	141
13. Infección con adenovirus	142
13.1 Amplificación de adenovirus	142
13.2 Purificación de adenovirus	142
13.3 Titulación de virus: método del ensayo de formación de calvas	143
13.4 Protocolo de infección	143
14. Ensayos de Hipoxia/OGD ( <i>Oxygen-Glucose Deprivation</i> )	144
15. Medida del consumo de oxígeno.	145
16. Análisis e interpretación de imágenes	146
16.1 Instrucciones básicas del ImageJ	146
16.2 Generación y manipulación de <i>Stacks</i>	146
16.3 Densitometría	148
16.4 Contaje de células	148
16.5 Movimiento de mitocondrias	149
16.6 Colocalización de dos objetos	151
16.7 Construcción de imágenes en 3D	153
17. Análisis estadístico	154
ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS	155
<b>OBJETIVOS</b>	<b>171</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>175</b>
LA FASE TEMPRANA DE LA FRAGMENTACIÓN MITOCONDRIAL EN EXCITOTOXICIDAD DEPENDE DE LA ACTIVACIÓN Y RECLUTAMIENTO DE DRP1	175
Alteración de la morfología mitocondrial ante el efecto de la excitotoxicidad	175
La activación de Drp1 induce la fragmentación mitocondrial temprana en excitotoxicidad	176
<i>Drp1 parece ser activada mediante una combinación de modificaciones post-traduccionales en excitotoxicidad</i>	179
<i>El papel del citoesqueleto en el reclutamiento de Drp1 a las mitocondrias</i>	184
<i>Otras posibles vías de fisión mitocondrial independientes de Drp1</i>	186

LA FASE TARDÍA DE LA FRAGMENTACIÓN MITOCONDRIAL ES IRREVERSIBLE	188
La expresión de Mfn2 se reduce bajo los efectos de la excitotoxicidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	188
Mfn2 interviene en una fase tardía e irreversible de la fragmentación mitocondrial	191
MFN2 REGULA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LAS MITOCONDRIAS EN EXCITOTOXICIDAD	195
La disminución de los niveles de Mfn2 afectan la homeóstasis del Ca <sup>2+</sup>	197
Mfn2 es importante para el tamponamiento del Ca <sup>2+</sup> y la comunicación de las mitocondrias con el retículo endoplasmático	198
La caída de los niveles de Mfn2 interviene en una vía de muerte tardía promovida por la excitotoxicidad	203
<i>Possible interacción entre Mfn2 y Bax</i>	207
En excitotoxicidad Mfn2 es regulada a nivel transcripcional	208
La caída en la expresión de Mfn2 durante la excitotoxicidad depende de MEF2	211
La expresión basal de Mfn2 es regulada directamente por MEF2 en neuronas	213
MFN2 ES IMPORTANTE PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE MITOFAGOSOMAS EN UN MODELO DE PARKINSON	215
DESARROLLO DE RATONES KD CONDICIONALES PARA MFN2	219
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>223</b>
La fase temprana de fisión mitocondrial en excitotoxicidad depende de la activación y reclutamiento de Drp1	223
La reducción de los niveles proteicos de Mfn2 genera la fragmentación mitocondrial de la fase tardía de la excitotoxicidad	226
Mfn2 es un factor imprescindible en la homeóstasis del Ca <sup>2+</sup> y la viabilidad neuronal	227
Mfn2 es regulada a nivel transcripcional en excitotoxicidad	229
La regulación a nivel transcripcional de Mfn2 en excitotoxicidad depende de MEF2	230
Mfn2 es un factor importante en la regulación de la autofagia	232
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>237</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>241</b>
<b>ANEXO 1</b> Tabla resumen de las proteínas pro-fusión y pro-fisión	<b>261</b>
<b>ANEXO 2</b> Artículo publicado en <i>The EMBO Journal</i>	<b>267</b>

---

## ABREVIATURAS

---

---

## ABREVIATURAS

A $\beta$  =  $\beta$  amiloide  
 $\Delta\Psi_m$  = Potencial de membrana mitocondrial  
AAV = Plásmido para la producción de AAV  
Ac = Anticuerpo  
Act D = Inhibidor transcripcional Actinomicina D  
Ag = Antígeno  
BDLP = *Bacterial dynamin-like protein*  
BSA = *Bovine serum albumin*  
CCCP = *Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone*  
CHX = Inhibidor traduccional Cicloheximida  
CL = Cardiolipina  
CMT2 = *Charcot-Marie-Tooth type 2*  
CsA = Ciclosporina A  
DM = Medio de disociación  
Drp1 = Proteína pro-fisión *dynamin-related protein 1*  
E = Enzima papaína  
ECL = *Enhanced chemiluminiscent Substrate*  
ER = Retículo endoplasmático  
GFP = *Green fluorescent protein*  
H<sup>+</sup> = protones  
HEK293 = Células embrionarias humanas de riñón  
HIV-1 = Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1  
Htt = Proteína Huntingtina  
Ig = Inmunoglobulina  
ITS = *Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Media Supplement*  
K = *Kynurinate Magnesium*  
LB = *Laemmli buffer*  
MAM = *Mitochondrial-associated membranes*  
Mdivi = *Mitochondrial división inhibitor*  
MDV = *Mitochondrial-derived vesicles*  
MEF2 = Factor de transcripción *myocyte enhancer factor-2*  
MEF2DN o DN-MEF2 = Vector dominante negativo de MEF2  
MEM = Minimum Essential Medium 1X  
Mfn1 y 2 = Proteínas pro-fusión (membrana externa mitocondria) Mitofusina 1 y 2  
MitoPLD = Fosfolipasa D mitocondrial  
MMP = *Matrix metalloproteinase*  
MOMP = *Mitochondrial outer membrane permeabilization*  
mtDNA = ADN mitocondrial  
NBA = *Neurobasal<sup>TM</sup>-A Medium*  
nNOS = Enzima NO sintasa  
NO = Óxido nítrico  
NMDAr = Receptor del glutamato N-metil D-aspartico o NMDA  
NP = Nonidet P40  
OGD = *Oxygen-glucose deprivation*  
Opa1 = Proteína pro-fusión (membrana interna mitocondria) *optic atrophy protein 1*  
o/n = *Over night*

---

PA = Ácido fosfatídico  
PC = Fosfatidilcolina  
PE = Fosfatidilethanolamina  
PI = Fosfatidilinositol  
PS = Fosfatidilserina  
PS1 y 2 = Enzimas Presenilinas 1 y 2  
PBS = Phosphate-Buffered saline  
PDL = Poli-D-Lisina  
P/E = Penicilina/Estreptomicina  
PTP = *Permeability transition pore*  
RCR = *Respiratory Control Ratio*  
RFP = *Red fluorescent protein*  
ROS = Radicales libres de oxígeno  
SESN2 = Proteína antioxidante Sestrina 2  
SD = Ratas Sprague Dawley  
Shsc = ShRNA *scrambled*  
SNC = Sistema Nervioso Central  
SRC = *Spare Respiratory Capacity*  
SUMO = *Small ubiquitin-related modifier*  
TA = Temperatura ambiente  
TMRM = *Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate*  
tPA = Activador tisular del plasminógeno  
WB = Western Blot

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> La penumbra isquémica.	43
<b>Figura 2.</b> Estructura y regulación del receptor NMDA.	44
<b>Figura 3.</b> Proceso excitotóxico y consecuencias.	46
<b>Figura 4.</b> Papel de Opa1 como candado ( <i>cristae junctions</i> ) de las crestas mitocondriales.	50
<b>Figura 5.</b> Esquema representativo de los genes codificados en el genoma mitocondrial.	52
<b>Figura 6.</b> Síntesis lipídica basada en la cardiolipina y enzimas involucrados.	54
<b>Figura 7.</b> Dominios proteicos identificados en las proteínas Mfn1, 2 y Opa1 humanas.	55
<b>Figura 8.</b> Expresión de Mfn2 en el cerebro de ratón.	56
<b>Figura 9.</b> Dominios sujetos a modificaciones post-traduccionales en la secuencia de Mfn2.	60
<b>Figura 10.</b> Esquema representando todos los factores que regulan la expresión transcripcional o proteica de Mfn2.	63
<b>Figura 11.</b> Proteasas descritas que actúan sobre Opa1.	64
<b>Figura 12.</b> Dominios estructurales de la proteína Drp1.	65
<b>Figura 13.</b> Regulación de Drp1.	66
<b>Figura 14.</b> Interacción de Fis1-Bap31 ante un estímulo apoptótico.	67
<b>Figura 15.</b> Funciones biológicas de los procesos de fusión y fisión mitocondrial.	70
<b>Figura 16.</b> Proceso de fusión transitoria observada en células HEK 293.	71
<b>Figura 17.</b> Esquema representativo de la orientación de las mitocondrias durante el proceso de fusión completa y transitoria ( <i>'kiss-and-run'</i> ).	71
<b>Figura 18.</b> Drp1 puede interaccionar con Mfn2 liberando el dominio HR2 de esta y favoreciendo la fusión mitocondrial.	73
<b>Figura 19.</b> Vías de entrada (captación) de $Ca^{2+}$ por parte de las mitocondrias en las zonas de contacto con el retículo endoplasmático (MAM).	75
<b>Figura 20.</b> El retículo endoplasmático es el responsable de marcar los puntos donde la mitocondria se fisiónará.	76
<b>Figura 21.</b> Modelos propuestos de transporte mitocondrial.	78
<b>Figura 22.</b> El $\beta$ amiloide induce la fisión mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer.	83
<b>Figura 23.</b> Modelo de dinámica mitocondrial incorporado con la progresión de la apoptosis.	88
<b>Figura 24.</b> Mecanismo y factores implicados en la necroptosis.	91
<b>Figura 25.</b> Formación del autofagosoma.	92
<b>Figura 26.</b> Formación del mitofagosoma y la degradación de su contenido.	94
<b>Figura 27.</b> Extracción de las cortezas cerebrales de rata.	108
<b>Figura 28.</b> Evolución del cultivo primario de neuronas.	110
<b>Figura 29.</b> Valores de excitación y emisión de 19 fluorocromos distintos	135
<b>Figura 30.</b> Microscopio de fluorescencia Olympus BX61/BX62 del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.	136
<b>Figura 31.</b> Microscopio Confocal Leica TCS SP2 de la Unidad de Microscopía Óptica Avanzada de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona.	137
<b>Figura 32.</b> Efecto de la excitotoxicidad sobre la morfología mitocondrial	176
<b>Figura 33.</b> Reclutamiento de Drp1.	177
<b>Figura 34.</b> El reclutamiento de Drp1 es independiente de un aumento en los niveles proteicos de Mff y Fis1.	178
<b>Figura 35.</b> Resultados positivos en la inhibición de la activación de Drp1 en excitotoxicidad.	184
<b>Figura 36.</b> El citoesqueleto juega un papel importante en el mantenimiento de la morfología mitocondrial.	185
<b>Figura 37.</b> Opa3 no promueve la fragmentación mitocondrial en excitotoxicidad.	186
<b>Figura 38.</b> La excitotoxicidad promueve una fase tardía e irreversible de la fragmentación mitocondrial	188
<b>Figura 39.</b> Los niveles de Mfn2 disminuyen en excitotoxicidad <i>in vitro</i> .	189

<b>Figura 40.</b> Los niveles proteicos de Mfn2 disminuyen específicamente en un modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD).	190
<b>Figura 41.</b> Caída de Mfn2 en un modelo <i>in vivo</i> de isquemia.	191
<b>Figura 42.</b> Los niveles proteicos de Mfn2 disminuyen de forma irreversible.	192
<b>Figura 43.</b> El ShRNA de Mfn2 promueve la caída de los niveles proteicos de Mfn2 y la fragmentación mitocondrial.	193
<b>Figura 44.</b> Esquema temporal.	194
<b>Figura 45.</b> Niveles inferiores de Mfn2 causan disfunciones mitocondriales.	196
<b>Figura 46.</b> La reducción en los niveles de Mfn2 altera la homeostasis del Ca <sup>2+</sup> .	197
<b>Figura 47.</b> Colocalización del retículo endoplasmático y las mitocondrias en neuronas corticales.	199
<b>Figura 48.</b> La caída de Mfn2 perjudica la captación de calcio liberado por el retículo endoplasmático por parte de las mitocondrias.	200
<b>Figura 49.</b> En excitotoxicidad las neuronas deficientes en Mfn2 son incapaces de tamponar el calcio liberado por el retículo endoplasmático.	201
<b>Figura 50.</b> Una comunicación deficiente entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias provoca una mayor activación de la proteasa Calpaína.	202
<b>Figura 51.</b> La caída de Mfn2 interviene en una fase tardía de muerte celular promovida por la excitotoxicidad.	205
<b>Figura 52.</b> La sobreexpresión de Mfn2 bloquea el reclutamiento de Bax a la mitocondria y la liberación de Citocromo c al citoplasma.	206
<b>Figura 53.</b> Esquema temporal.	207
<b>Figura 54.</b> El dominio 392-602 de Mfn2 podría estar interaccionando con Bax.	208
<b>Figura 55.</b> Mfn2 no es degradada vía proteasoma en excitotoxicidad.	209
<b>Figura 56.</b> Mfn2 es regulada a nivel transcripcional en excitotoxicidad.	210
<b>Figura 57.</b> Los niveles proteicos de MEF2 caen en excitotoxicidad.	211
<b>Figura 58.</b> La caída de Mfn2 en excitotoxicidad depende de MEF2.	213
<b>Figura 59.</b> La Rotenona promueve la caída de los niveles de mRNA y proteína de Mfn2.	215
<b>Figura 60.</b> El aumento de los niveles de Mfn2 protege ante la mitofagia mientras que su caída altera los autofagosomas.	213
<b>Figura 61.</b> La Rotenona afecta la morfología mitocondrial.	217
<b>Figura 62.</b> Esquema temporal.	218
<b>Figura 63.</b> Modelo propuesto para comprender los cambios acaecidos en la morfología mitocondrial y la vulnerabilidad neuronas en condiciones de excitotoxicidad.	231
<b>Figura I.</b> Cadena respiratoria.	51
<b>Figura II.</b> Proteína BDLP bacteriana.	57
<b>Figura III.</b> Contactos entre mitocondrias y melanosomas.	80
<b>Figura IV.</b> Generación de MDVs.	81
<b>Figura V.</b> Anillo de división mitocondrial observado por microscopía electrónica en el moho <i>P. polycephalum</i> .	90

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Listado de anticuerpos primarios utilizados	155
<b>Tabla 2</b> Listado de anticuerpos secundarios utilizados	156
<b>Tabla 3</b> Listado de plásmidos utilizados	157
<b>Tabla 4</b> Listado de <i>primers</i> utilizados	162
<b>Tabla 5</b> Listado de inhibidores	163
<b>Tabla 6</b> Listado de <i>kits</i> utilizados	164
<b>Tabla 7</b> Listado de enzimas, reactivos y productos utilizados	165
<b>Tabla 8</b> Listado de equipos utilizados	167
<b>Tabla 9</b> Inhibidores y vectores probados para determinar la activación de Drp1 en excitotoxicidad	181
<b>ANEXO 1</b> Tabla resumen de las proteínas pro-fusión y pro-fisión	261

---

---

## ÍNDICE DE *BOXES*

---

---

## ÍNDICE DE *BOXES*

<b>BOX 1</b> Composición y funcionamiento de la cadena respiratoria	50
<b>BOX 2</b> Descubrimiento de la proteína ancestral de las Mitofusinas	56
<b>BOX 3</b> Interacción entre mitocondrias y peroxisomas/lisosomas mediante las MDVs	79
<b>BOX 4</b> Relación entre la dinámica mitocondrial y la apoptosis	89

---

---

# INTRODUCCIÓN

---

---

## EL ICTUS Y LA EXCITOTOXICIDAD

### Ictus o infarto cerebrovascular

La palabra ictus proviene del latín y significa golpe (*stroke* en inglés), palabra que describe el carácter brusco y repentino del proceso. Cuando el suministro de sangre a una parte del cerebro se interrumpe repentinamente por la presencia de un coágulo o cuando un vaso sanguíneo en el cerebro se rompe, derramando sangre en los espacios que rodean a las células cerebrales, clínicamente se reconoce como que esa persona ha sufrido un ictus o infarto/accidente cerebrovascular. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el ictus es, tras las enfermedades cardíacas y el cáncer, la tercera causa de muerte y constituye la principal causa de discapacidad en el adulto (OMS, 2007). En España, según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), las enfermedades cerebrovasculares son la primera causa de muerte entre las mujeres y la tercera entre los hombres (INE, 2006). El problema que presentan los países en vías de desarrollo es que cada año aumenta la incidencia del ictus mientras que en los países industrializados, es más o menos estable.

En España se estima que alrededor de 84.000 personas sufren algún tipo de accidente cerebrovascular agudo cada año. En Estados Unidos de América (USA) ocurre un ictus cada 40 segundos y éstos causan una muerte cada 4 minutos (Lloyd-Jones D, et al. 2009). La incidencia del ictus es de 250-400 casos por cada 100.000 habitantes y su mortalidad ronda la media del 30 % aunque depende mucho de cada país. De entre los supervivientes, el 70 % presentan algún tipo de capacidad comprometida para el trabajo aunque viven en condiciones razonablemente buenas o con déficits moderados. El resto (30 %) queda totalmente incapacitado y dejan de poder depender de ellos mismos. El infarto cerebrovascular es una patología que disminuye tanto la calidad de vida como la esperanza de vida de los afectados suponiendo, además, un notable incremento del gasto sanitario (Lloyd-Jones D, et al. 2009).

Es muy importante saber reconocer los síntomas de alarma asociados a un ictus porque pueden ser el primer aviso antes de sufrirlo. Es importante reconocerlos y buscar asistencia sanitaria urgentemente, ya que el pronóstico dependerá en gran medida de la rapidez en la instauración del tratamiento. Los síntomas se manifiestan a nivel neurológico. Pueden ser alteraciones de la sensibilidad de algún sentido en cualquier parte del cuerpo, la pérdida de fuerza en una mitad del cuerpo y/o presentar algún trastorno repentino o dificultad para entender o hablar. Actualmente, la única forma de evitar las consecuencias en una persona que ha sufrido un ictus pasan por eliminar la obturación cuanto antes y restablecer el riego sanguíneo, ya sea por cirugía o con el uso de agentes fibrinolíticos como el activador tisular del plasminógeno (tPA) (NINDS, 1995). Sin embargo, por el alto riesgo de hemorragia que comporta, solamente un 0,5 % de los pacientes reciben este tratamiento.

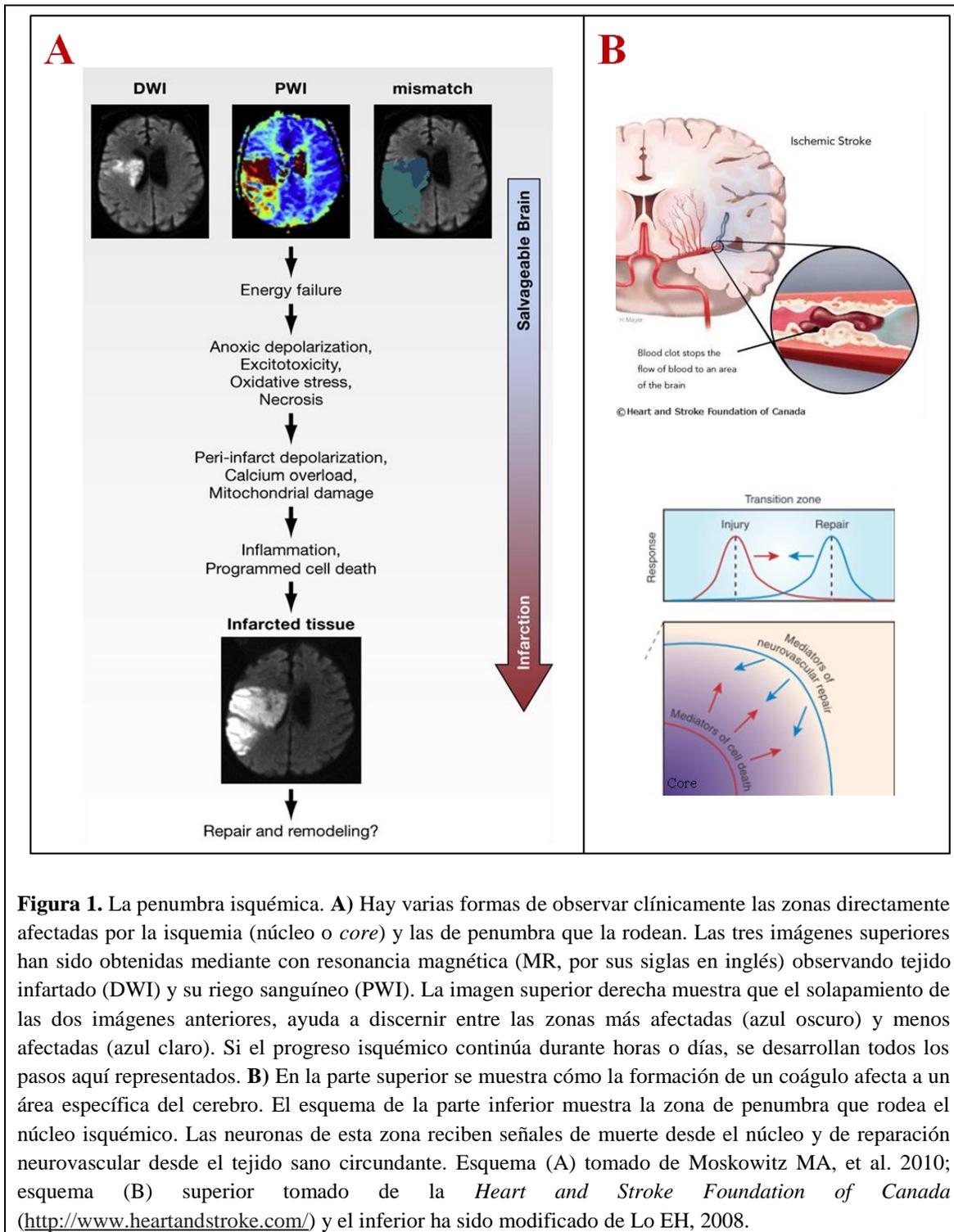
De los cientos de fármacos que se han desarrollado para tratar el ictus y que presentaron buenos resultados en animales, ninguno se ha aprobado en humanos por su baja eficiencia y todos han sido suprimidos de las fases de ensayos clínicos (Caplan LR, 1998; Muir KW & Grosset DG, 1999; Kaste M, 2005; Mehta SL, et al. 2007). Otras terapias que se han intentado llevar al mercado son las que afectan el receptor NMDA. Todas ellas, más de 100, también han dado resultados negativos durante los ensayos clínicos y se han frenado debido a los efectos perjudiciales que provocaban (Ikonomidou C & Turski L, 2002; Muir KW, 2006; Ginsberg MD,

---

2009). Así pues, podemos afirmar que el estudio de los mecanismos celulares y moleculares, aún muy desconocidos, implicados en el proceso del ictus es esencial para tener éxito en el diseño de terapias neuroprotectoras.

Los factores de riesgo descritos para el ictus son numerosos y se clasifican entre causales como la hipertensión y probables como la falta de ejercicio. En el cerebro, todos estos factores de riesgo están asociados con una reducción del flujo sanguíneo cerebral, favoreciendo la formación de coágulos (Moskowitz MA, et al. 2010). Esta alteración vascular incrementa la vulnerabilidad del cerebro a sufrir una isquemia después de una oclusión arterial. La palabra isquemia proviene del griego 'iskh' (detener) + 'haimía' (sangre). Así la isquemia cerebral podríamos definirla como la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo en el cerebro producida por una alteración patológica de la arteria o arterias aferentes al mismo. Las isquemias suelen ser del tipo trombótico cuando se forma un coágulo en una de las arterias o vasos que irrigan el cerebro provocando la obstrucción del mismo, y las de tipo embólico, cuando el coágulo se forma en alguna otra parte del cuerpo y viaja hacia el cerebro a través del torrente sanguíneo.

La isquemia es un proceso complejo y el daño en la zona infartada promueve la activación de diversos mecanismos de muerte vinculados al aumento de radicales libres de oxígeno (ROS), activación de proteasas dependientes de  $Ca^{2+}$  y desregulación del metabolismo de los fosfolípidos, entre otras cosas (Lipton P, 1999). Las técnicas utilizadas para la detección de un ictus son la tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) con el que se puede identificar tejido cerebral con bajo riego sanguíneo (Baron JC, 2001) y las imágenes por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés) para detectar porciones de tejido isquémico que todavía no han sucumbido a la necrosis (Warach S, 2003). En isquemia, la obstrucción de un vaso sanguíneo produce un gradiente de la lesión que se caracteriza por una isquemia intensa en el centro del territorio vascular afectado y una isquemia menos severa en su periferia (**Figura 1**). En 1977, Astrup y sus colegas definieron esta zona periférica al núcleo de la afección, como penumbra (Astrup J, et al. 1977). Estas áreas se caracterizan por ser zonas dañadas pero no muertas, habiendo la posibilidad de salvarlas si se restablece la situación normal. Las neuronas de las zonas de penumbra muestran alteraciones de carácter funcional aunque conservan una mínima actividad metabólica que hace que preserven su integridad estructural durante más tiempo (Lo EH, 2008). A pesar de ello, las proteasas de la familia de las MMPs (*matrix metalloproteinase*, por su nombre en inglés) liberadas a la matriz extracelular por las neuronas del núcleo de la afección, dañan la barrera hematoencefálica y causan edemas, hemorragias y promueven la muerte neuronal (Cunningham LA, et al. 2005). La mayoría de señales neuroprotectoras que son enviadas a la zona de penumbra desde las neuronas del tejido sano circundante, tienen dos efectos distintos, se ha demostrado que tanto pueden promover la muerte celular como proteger ante ella, todo depende del contexto (Gao Y, et al. 2005; Waetzig V, et al. 2006).



**Figura 1.** La penumbra isquémica. **A)** Hay varias formas de observar clínicamente las zonas directamente afectadas por la isquemia (núcleo o *core*) y las de penumbra que la rodean. Las tres imágenes superiores han sido obtenidas mediante con resonancia magnética (MR, por sus siglas en inglés) observando tejido infartado (DWI) y su riego sanguíneo (PWI). La imagen superior derecha muestra que el solapamiento de las dos imágenes anteriores, ayuda a discernir entre las zonas más afectadas (azul oscuro) y menos afectadas (azul claro). Si el progreso isquémico continúa durante horas o días, se desarrollan todos los pasos aquí representados. **B)** En la parte superior se muestra cómo la formación de un coágulo afecta a un área específica del cerebro. El esquema de la parte inferior muestra la zona de penumbra que rodea el núcleo isquémico. Las neuronas de esta zona reciben señales de muerte desde el núcleo y de reparación neurovascular desde el tejido sano circundante. Esquema (A) tomado de Moskowitz MA, et al. 2010; esquema (B) superior tomado de la *Heart and Stroke Foundation of Canada* (<http://www.heartandstroke.com/>) y el inferior ha sido modificado de Lo EH, 2008.

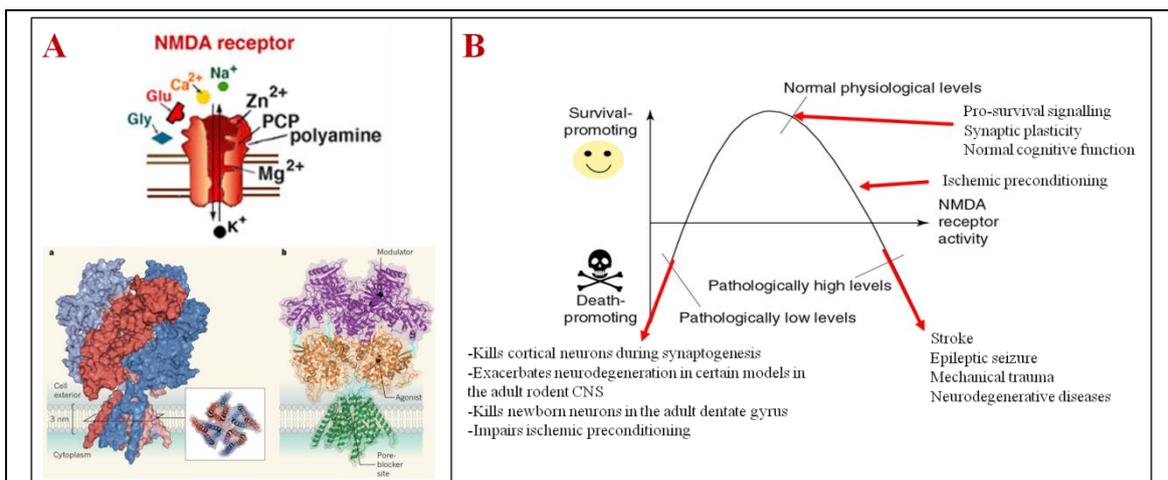
### El receptor NMDA (NMDAR)

El principal receptor ionotrópico para el glutamato es el N-metil D-aspartato o NMDA (NMDAR). Es un heterotetrámero esencial en la plasticidad sináptica, el desarrollo neuronal y la transmisión sináptica (Bliss TV & Collingridge GL, 1993). El NMDAR está constituido por las subunidades NR1-NR2 o NR1-NR3. NR1 forma un dímero consigo mismo y crea el canal iónico propiamente dicho donde reside también el lugar de unión del glutamato, el lugar de

bloqueo por el ión magnesio y es sensible al pH. Por otro lado, NR2 y NR3 unen proteínas postsinápticas y juegan un papel más específico como moduladores de las características de NR1 (Lau A & Tymianski M, 2010). El NMDAR es muy importante en la memoria y el aprendizaje y se localiza tanto en la hendidura sináptica como en los espacios extrasinápticos (Petralia RS, et al. 2010). Además, se ha vinculado con la inducción de la muerte celular en muchas patologías neurológicas (tal como se explica más adelante).

Es un canal permeable para  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Su estructura le permite unir glutamato y glicina. La unión del ión  $\text{Mg}^{2+}$  promueve el bloqueo del receptor mientras que el  $\text{Zn}^{2+}$  lo inactiva (**Figura 2 A**). Además, también puede unir varias poliaminas (Lau A & Tymianski M, 2010). El receptor ionotrópico AMPA forma parte de la misma familia que el NMDA. A nivel fisiológico, el ión magnesio que bloquea el NMDAR, es eliminado mediante la activación de AMPA. El papel de las poliaminas en la modulación del NMDAR no está muy clara y se cree que está vinculado a promover tanto el crecimiento como la muerte celular. Además, se ha descrito que los protones ( $\text{H}^+$ ) pueden inhibir el receptor vía su interacción directa con la subunidad NR1 (Traynelis SF & Cull-Candy SG, 1990). Sobre el receptor NR2 cabe recalcar que se ha descrito que puede unir proteínas creando microambientes postsinápticos especializados (Sattler R, et al. 1999). Esta estrecha asociación se lleva a cabo por densidades postsinápticas que comprenden proteínas de ensamblaje que permiten la aproximación espacial de enzimas intracelulares y segundos mensajeros iónicos. El efecto fisiológico de esta relación espacial puede ser dramática y se ha demostrado en estudios con animales para reducir el daño histológico después del infarto cerebrovascular (Lau A & Tymianski M, 2010).

Tanto la sobre-activación como la inhibición del receptor NMDA produce efectos dañinos para la neurona activando vías de muerte (**Figura 2 B**). Por este motivo, todas las terapias diseñadas contra este receptor han fallado. El control de sus niveles promueve señales de supervivencia y plasticidad sináptica. Una sobre-activación se asocia con isquemia, epilepsia y enfermedades neurodegenerativas crónicas como Alzheimer, Parkinson y Huntington. Por otro lado, su inhibición se ha detectado que causa muerte en neuronas corticales (Hardingham GE & Bading H, 2003).



**Figura 2.** Estructura y regulación del receptor NMDA. **A)** El receptor NMDA es un canal para el calcio de la membrana plasmática de las neuronas. Su estructura es muy compleja y une ligandos como la glicina y el glutamato. Además, puede unir varios iones como el  $\text{Zn}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  que regulan su función. **B)** La regulación del receptor debe ser muy precisa ya que una sobre-activación como su inhibición

---

generan consecuencias graves ligadas con enfermedades tales como ictus, epilepsia y las neurodegenerativas crónicas más comunes (Alzheimer, Parkinson, etc).. Esquema (A) superior tomado de Kandel ER, et al. 1991; esquema inferior tomado de Stroebel D & Paoletti P, 2014. Esquema (B) modificado de Hardingham GE & Bading H, 2003.

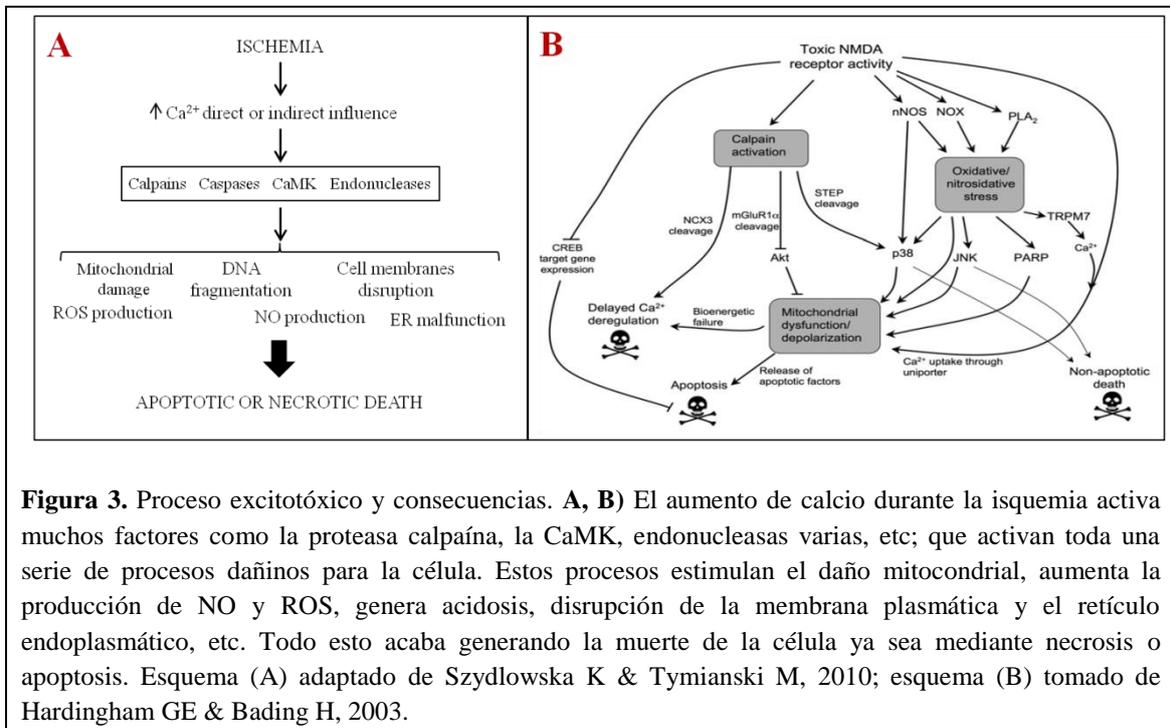
Se ha demostrado que el daño generado por la activación del receptor NMDA no solamente está vinculada a los efectos del calcio y las cascadas de señalización que se activan, sino a la localización del propio receptor. Los receptores que se hallan en el espacio sináptico son de tipo neuroprotectores mientras que los extrasinápticos están preferentemente ligados a vías de muerte. Según este concepto, la entrada masiva de calcio *per se* no es el único determinante de la toxicidad, sino más bien el hecho de que el calcio fluya a través de los receptores sinápticos o los extrasinápticos (Hardingham GE & Bading H, 2010).

### **El proceso excitotóxico y las vías de señalización del $\text{Ca}^{2+}$**

La interrupción del flujo sanguíneo en el cerebro durante la isquemia provoca una secuencia de procesos patofisiológicos en el espacio y en el tiempo que en conjunto recibe el nombre de cascada isquémica. Estos procesos siguen un orden específico aunque pueden solaparse. Uno de los principales fenómenos que se observan es la bajada brusca de la concentración de la glucosa y de la presión parcial del oxígeno en la zona afectada por la isquemia. Estos desbarajustes provocan la inhibición de la cadena transportadora electrónica mitocondrial y, en consecuencia, el bloqueo de la fosforilación oxidativa. La síntesis de ATP cae a la vez que se pierde el gradiente electroquímico mitocondrial, afectando el correcto funcionamiento de los procesos celulares dependientes de ATP (Katsura K, et al. 1993). La caída de la energía provoca que las bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana plasmática pierden actividad haciendo que el  $\text{Na}^+$  se acumule en el interior de la célula y que el  $\text{K}^+$  salga masivamente al espacio extracelular lo que desencadena una importante despolarización de la membrana de las células. Este proceso se denomina despolarización anóxica (Katsura K, et al. 1994). Como consecuencia, las neuronas se ven obligadas a utilizar la glucosa por la vía anaeróbica, lo cual hace que se acumulen lactato y se acidifique el medio (Rehncrona S, 1985).

La despolarización anóxica desencadena una liberación de vesículas de neurotransmisores ricos en glutamato, el neurotransmisor excitatorio mayoritario del cerebro, desde las neuronas presinápticas a la hendidura sináptica, en una fase muy temprana de la isquemia. La acumulación del glutamato activa los receptores NMDA de forma casi permanente instigando el efecto excitotóxico. El término ‘excitotoxicidad’ fue acuñado por primera vez en 1969 para describir el proceso por el cual el glutamato promueve toxicidad (Olney JW, 1969). En condiciones normales los transportadores de glutamato transportan el aminoácido excitatorio al interior de la célula, pero la despolarización de la membrana plasmática provoca una reversión de su función y, por tanto, contribuye a que la concentración de glutamato en el espacio extracelular aumente hasta niveles tóxicos (Rossi DJ, et al. 2000; Soriano FX & Hardingham GE, 2007). Los mecanismos de excitotoxicidad pueden provocar necrosis pero también pueden iniciar algunos procesos moleculares que conducen a la apoptosis (**Figura 3**) (Dirnagl U, et al. 1999). La consecuencia de la activación reiterada de los NMDAR desencadena una entrada masiva de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la neurona. Esta desregulación genera, a nivel tisular, una entrada de  $\text{Cl}^-$  y agua, produciendo un edema cerebral facilitando la restricción del flujo sanguíneo en otras zonas circundantes del cerebro (Dirnagl U, et al. 1999). A diferencia de lo

que ocurre en el núcleo de la lesión, en la zona de penumbra las neuronas son capaces de repolarizarse tras la liberación inicial de glutamato aunque les supone un gasto energético extra. Este proceso no puede ser mantenido durante mucho tiempo por las neuronas y acaba provocándose una falta de energía en otros procesos básicos. De modo que vuelven a despolarizarse. Este efecto de recuperación-caída se repite varias veces y se llama despolarización peri-infarto. A medida que va ocurriendo, mayor se hace el área del infarto (Hossmann KA, 1996).



**Figura 3.** Proceso excitotóxico y consecuencias. **A, B)** El aumento de calcio durante la isquemia activa muchos factores como la proteasa calpaína, la CaMK, endonucleasas varias, etc; que activan toda una serie de procesos dañinos para la célula. Estos procesos estimulan el daño mitocondrial, aumenta la producción de NO y ROS, genera acidosis, disrupción de la membrana plasmática y el retículo endoplasmático, etc. Todo esto acaba generando la muerte de la célula ya sea mediante necrosis o apoptosis. Esquema (A) adaptado de Szydłowska K & Tymianski M, 2010; esquema (B) tomado de Hardingham GE & Bading H, 2003.

Muchas rutas celulares se ven afectadas cuando la entrada de calcio es masiva. La excitotoxicidad, la anoxia y la isquemia cerebral producen estos efectos. La entrada de calcio provoca una activación enzimática masiva, ya que bastantes enzimas son dependientes de calcio, como la proteína quinasa C (PKC), la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), la fosfolipasa C (PLC), la óxido nítrico sintasa (nNOS), endonucleasas, lipasas y diversas proteasas, como la calpaína, entre otras (Szydłowska K & Tymianski M, 2010). Cabe resaltar que las calpains son las responsables de proteolizar hasta el 5 % de las proteínas totales de la célula. Su regulación es muy importante y se ha demostrado que inhibirla podría ser un modelo de neuroprotección ante muchas enfermedades neurodegenerativas (Wang KK, et al. 1989).

En condiciones fisiológicas, los radicales libres de oxígeno son eliminados tanto por mecanismos enzimáticos, por la acción de las enzimas superóxido dismutasa, las catalasas y la glutatión peroxidasa, como por mecanismos no enzimáticos como las vitaminas E y C y el glutatión (Halliwell B & Gutteridge JM, 1985). Tras la isquemia se produce mucho estrés oxidativo que provoca la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daño estructural a nivel del ADN.

Ante el aumento del calcio citoplasmático, orgánulos tamponadores como las mitocondrias y el retículo endoplasmático, empiezan a actuar intentando capturar este ión dañino que se acumula. Mediante un gradiente de protones electroquímico generado por la cadena transportadora de

---

electrones, las mitocondrias capturan  $\text{Ca}^{2+}$  provocando despolarización (Loew LM, et al. 1994). En estas circunstancias tan dañinas para todo el conjunto, la célula intenta, por todos los medios, redirigir el ATP que se genera para intentar expulsar calcio hacia el exterior celular. La acumulación del calcio en las mitocondrias es el evento más temprano en la muerte neuronal promovida por la excitotoxicidad. Esta situación se mantiene hasta un punto en que las mitocondrias ven caer su producción de ATP debido a una desregulación de la homeostasis del calcio y se empiezan a activar vías de señalización vinculadas a la apoptosis: liberación del citocromo c, de AIF y Smac/DIABLO al citosol y la activación de las caspasas (Liu X, et al. 1996).

### **Excitotoxicidad y las enfermedades neurodegenerativas asociadas**

Hay fuertes evidencias que relacionan la toxicidad del glutamato con la actividad del NMDAR en diversas patologías. El ictus se produce cuando una arteria revienta o se tapona, dejando a una zona del cerebro sin riego sanguíneo, lo que comporta que las células cercanas no reciban nutrientes ni oxígeno. Este ambiente anóxico pobre en nutrientes, produce un colapso energético que provoca un aumento de los niveles de glutamato extracelular que afecta directamente a las neuronas (Astrup J, et al. 1977; Choi DW & Rothman SM, 1990; Lo EH, 2008). En enfermedades crónicas como el Huntington, se ha descrito que la proteína huntingtina mutada (Htt) puede modificar directamente la función del NMDAR mediante la interacción con PSD95 (Fan MM & Raymond LA, 2007). En 2008, se observó que la señalización glutamatérgica se ve comprometida por la modulación sináptica que genera las acumulaciones de  $\beta$  amiloide ( $\text{A}\beta$ ) y proteína tau en los NMDAR en regiones específicas del cerebro en la enfermedad de Alzheimer (Miguel-Hidalgo JJ, et al. 2002; Parameshwaran K, et al. 2008). En la enfermedad de Parkinson, la proteína Parkina mutada desencadena la formación de sinapsis glutamatérgicas. Esto se asocia a un aumento de la vulnerabilidad a la excitotoxicidad (Helton TD, et al. 2008).

La isquemia y las demencias van cogidas de la mano ya que el cerebro afectado por los problemas vasculares ven perder capacidad de cognición. Si los ictus son múltiples, la zona afectada puede verse incrementada y deteriorada a la vez provocando un daño mayor. De hecho, se ha calculado que en el 60 % de los casos coexisten una enfermedad neurodegenerativa como el Alzheimer, por ejemplo, y una patología cerebrovascular (Moskowitz MA, et al. 2010). La conexión entre las dos patologías puede deberse a que el  $\text{A}\beta$  tiene efectos directos sobre los vasos sanguíneos del cerebro. Estos pueden verse constreñidos por el  $\text{A}\beta$  viéndose afectado el flujo, lo que genera que la susceptibilidad a una isquemia aumente (Iadecola C, 2004). De forma contraria, la isquemia y la hipoxia pueden inducir la acumulación de  $\text{A}\beta$  promoviendo el corte del APP, la molécula precursora del  $\text{A}\beta$ . Se genera así un círculo vicioso entre ambas patologías. Estos descubrimientos apuntan a que los mecanismos que siempre se han creído específicos de cada enfermedad, no lo son tanto en realidad. Hay mucho más solapamiento entre ellas de lo que se imaginaba.

La excitotoxicidad es un fenómeno que ocurre en muchas enfermedades neurodegenerativas tanto crónicas como agudas. Su estudio y comprensión a nivel fisiológico es muy importante pero los esfuerzos hay que dirigirlos a desentrañar los mecanismos moleculares implicados, buscar la sinergia entre disciplinas y conocimientos e integrarlos todos para hallar algún método curativo. En el campo de la Neurología se ha demostrado que las enfermedades no son entes aislados, hay muchas conexiones entre ellas y muchos se focalizan en las mitocondrias.

---

## LA DINÁMICA MITOCONDRIAL

### Introducción a las mitocondrias

Coloquialmente conocidas como las centrales energéticas de la célula, las mitocondrias han demostrado ser pilares imprescindibles en muchos de los mecanismos principales y primordiales de la célula. La palabra mitocondria proviene del alemán ‘*Fadenkörper*’ (cuerpos de hilos) y del griego ‘*mitos*’ (hilos) y ‘*chondrion*’ (granos pequeños), siendo éste último el que arraigó en la comunidad científica. Concretamente fue acuñado en 1898 por el microbiólogo alemán Carl Benda, refiriéndose al aspecto que presentaban las mitocondrias observadas durante la espermatogénesis, mecanismo encargado de la producción de espermatozoides (Benda C, et al. 1898).

El típico aspecto de judía con el que la mayoría de libros muestran las mitocondrias nos han hecho creamos una imagen errónea de la realidad. La célula contiene muchos de estos orgánulos que se desplazan e interaccionan entre ellos y con el resto de estructuras. Todas las células de nuestro cuerpo contienen mitocondrias, exceptuando los eritrocitos y es muy difícil calcular un número aproximado de mitocondrias por tipo celular porque éstas están continuamente fusionándose y fisionándose, cambiando de tamaño, forma y localización. Del mismo modo, poder afirmar si una mitocondria es larga (aspecto tubular) o corta (aspecto granuloso) es una tarea ardua si estás trabajando con técnicas de *live cell imaging*. El dinamismo que demuestran tener es muy elevado ya que en neuronas, por ejemplo, una sola mitocondria puede ocupar la mayor parte del interior y gran parte de la longitud de una dendrita. La hiper-fusión tampoco es buena porque acaba apelotonando todas las mitocondrias en una bola que no puede llevar a cabo sus funciones más primordiales.

A lo largo de la historia, la investigación de las mitocondrias ha tenido influencia sobre numerosas disciplinas científicas. Los primeros estudios que se realizaron estaban enfocados desde una perspectiva fisiológica para situar el papel de las mitocondrias en el gran esquema celular. Pero, ¿dónde está el inicio? Antes se ha comentado que el origen del nombre proviene de 1898, pues bien, quizás lo más correcto sería remontarnos 8 años más atrás en la historia y centrarnos en el patólogo e histólogo alemán Richard Altmann que en su libro de 1890 describió las mitocondrias como ‘*elementary organism*’ que vivían dentro de las células y eran responsables de ciertas funciones vitales (Altmann R. 1890). En realidad, hay observaciones muy básicas que se hicieron sobre las mitocondrias en la década de 1840, unos pocos años después de que se descubriera el núcleo de las células. Pero Altmann fue el primero en describirlos.

Las primeras funciones metabólicas básicas en describirse sobre las mitocondrias fueron el ciclo de Krebs (1937), la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (1950), la fosforilación oxidativa (1953) y el metabolismo de ciertos aminoácidos (1958). Su estructura no deslumbró a la comunidad científica hasta los años cincuenta con la invención del microscopio electrónico. En este contexto cabe resaltar el trabajo realizado por el biólogo rumano George Palade y el físico e histólogo sueco Fritiof Sjöstrand. Ellos fueron los primeros en describir los distintos elementos membranosos de las mitocondrias y las definieron como membrana externa, membrana interna y las crestas mitocondriales. A principios de la década de 1960, a la vez que se describía la capacidad de las mitocondrias por incorporar calcio, se descubrió el ADN mitocondrial (Nass S

---

& Nass MM, 1963). Este descubrimiento impulsó un interesante debate ya iniciado años atrás sobre el origen de las mitocondrias. Finalmente, otros descubrimientos a destacar como la importación de proteínas desde el citoplasma a las mitocondrias y el papel de estos orgánulos en el control de la apoptosis, han promovido considerablemente el interés hacia su investigación y, sobre todo, hacia múltiples enfermedades vinculadas directa o indirectamente al buen funcionamiento de las mitocondrias (Ernster L & Schatz G, 1981).

En 1959, el endocrinólogo sueco Rolf Luft, describió el caso de una mujer joven con un metabolismo acelerado, que se caracteriza por sudoración profusa y pérdida de peso junto a un alto consumo de calorías. Las pruebas demostraron un desacoplamiento de las mitocondrias en el paciente y desencadenó el estudio y la comprensión de estos orgánulos desde una perspectiva médica (Vafai SB & Mootha VK, 2012). Actualmente se conocen más de 150 síndromes genéticos distintos relacionados con las mitocondrias. En los últimos años se ha relacionado la mala regulación de la dinámica mitocondrial con múltiples patologías de índole muy diversa como enfermedades neurodegenerativas crónicas (Alzheimer, Parkinson, Huntington y ELA) y agudas (ictus, ataques epilépticos y traumatismos craneales), trastornos multifactoriales comunes (diabetes), cáncer, sida, etc (Zorzano A, et al. 2009).

Todo lo anterior reafirma que las mitocondrias son mucho más que simples centrales energéticas. Su relación con enfermedades está despertando actualmente una nueva forma de estudiarlas hasta el punto que, por ejemplo, la comunidad científica está poniendo en entredicho si la acumulación característica de ciertas proteínas en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson o el Huntington, son meras consecuencias de un proceso patológico con una posible causa originada en las mitocondrias ya que dichas proteínas que se acumulan realizan parte de sus funciones en estos orgánulos, concretamente en las zonas de unión entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias (Schon EA & Przedborski S, 2011).

Se ha avanzado mucho en la investigación de estos orgánulos pero todavía tienen mucho que desvelarnos.

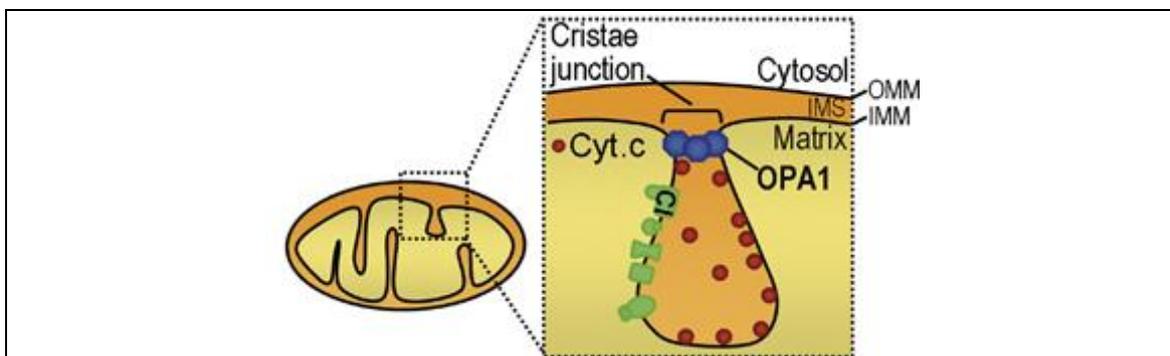
### **Estructura, composición y funciones de las mitocondrias**

Tal como describieron Palade y Sjöstrand en los años cincuenta, las mitocondrias están formadas por dos membranas, la externa y la interna. De la membrana interna se generan por invaginación, las crestas mitocondriales. La membrana externa está repleta de proteínas, muchas de ellas muy importantes para la regulación de la dinámica mitocondrial. Una muy abundante es la llamada Porina o VDAC, un canal de estructura muy similar a las porinas bacterianas. La funcionalidad de estos canales es permitir el paso de iones y la mayoría de las moléculas pequeñas que no superen los 5000 Da (Shoshan-Barmatz V, et al. 2010). A pesar de que la membrana externa permita el flujo de metabolitos, son la membrana interna y las crestas las principales barreras de permeabilidad entre el citosol y la matriz mitocondrial.

Se han propuesto varios modelos hipotéticos para explicar la formación y aparición de las crestas. El primero de ellos fue desarrollado por Palade al afirmar que las crestas eran invaginaciones de la membrana interna y estaba llena de aberturas. Por otro lado, Sjöstrand propuso el modelo de septos donde defendía que el interior de la mitocondria y la membrana interna se encontraba totalmente cortada de extremo a extremo por grandes septos. Fue en 1966,

con el avance de las técnicas de corte y microscopía electrónica, que se describió el modelo donde se defiende que las crestas en forma tubular estaban conectadas a la membrana interna de las mitocondrias, dando la razón a Palade (Daems WT & Wisse E, 1966). Más adelante, técnicas de tomografía electrónica desvelaron que las crestas están estrechamente unidas a la membrana interna originando aberturas tubulares que se llamaron ‘*cristae junctions*’ (Mannella CA, et al. 1994). Estas estructuras tubulares presentan un diámetro de entre 12 y 40 nm y tienen una longitud media de 30 a 50 nm aunque se han medido algunos de 150-200 nm en *Neurospora crassa* (Zick M, et al. 2009).

En el interior de las crestas mitocondriales se han detectado proteínas tan importantes como la gran mayoría de ATP sintasas y los distintos complejos de la cadena respiratoria (ver **BOX 1**), entre otras; lo que hizo pensar que estas estructuras representan, en realidad, zonas especializadas que deben aislarse del resto. Este aislamiento quedó claro cuando se describió que Opa1, una proteína GTPasa residente en la membrana interna e implicado en la fusión de las membranas internas de dos mitocondrias (de la cual hablaremos más adelante), era la responsable de cerrar las crestas y formar los ‘*cristae junctions*’ (Frezza C, et al. 2006; Chen H & Chan DC, 2009). Por primera vez se describió una nueva función de Opa1 independiente de la ya conocida en la fusión. Durante la apoptosis, el complejo formado por Opa1 se desasocia promoviendo la apertura de las crestas y la liberación del citocromo c hacia el espacio intermembranal (**Figura 4**). En caso de que en la membrana externa de la mitocondria se hayan formado los poros de permeabilidad (PTP, por sus siglas en inglés) por la unión de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, este citocromo c puede pasar al citoplasma e iniciar la activación de las caspasas y la muerte celular por apoptosis (Ramonet D, et al. 2013).



**Figura 4.** Papel de Opa1 como candado (*cristae junctions*) de las crestas mitocondriales. Se esquematiza como Opa1 cierra las crestas donde se encuentran los distintos complejos de la cadena respiratoria contando también con el citocromo c. Esquema tomado de Ramonet D, et al. 2013.

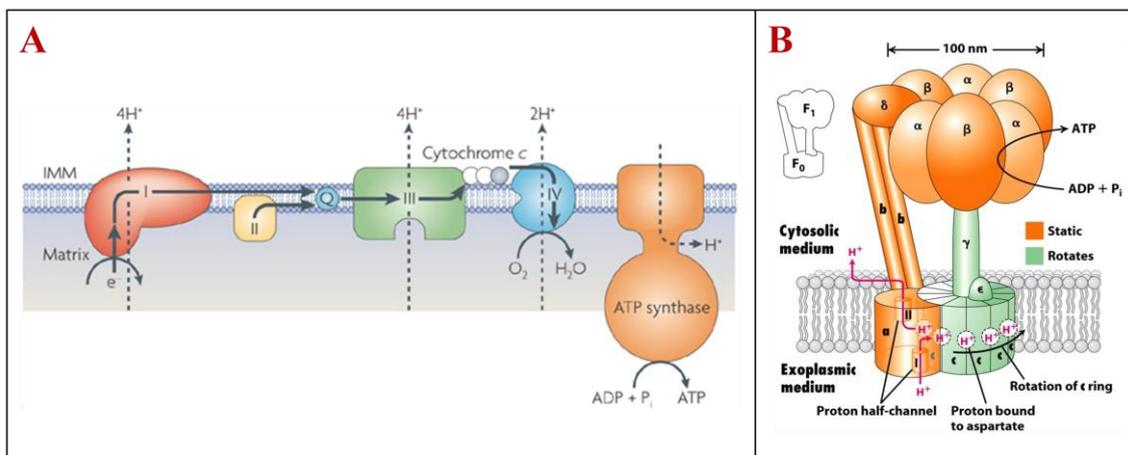
### **BOX 1** Composición y funcionamiento de la cadena respiratoria

La entrada de electrones en la cadena de transporte electrónica de la membrana interna de las mitocondrias es lo que inicia la fosforilación oxidativa. La cadena en sí está formada por cuatro complejos proteicos unidos a la membrana (complejos I – IV). Los electrones pasan a través de ellos (representado en la Figura por las flechas negras punteadas) con la ayuda de los propios transportadores de electrones, es decir, la ubiquinona (Q), el citocromo c y proteínas hierro-azufre. Justamente la transferencia de los electrones a través de estos complejos es lo que produce una reacción altamente exergónica (reacción química donde la variación de la energía libre de Gibbs es negativa) que se utiliza para bombear los protones ( $H^+$ ) desde la matriz

mitocondrial hacia el espacio intermembranal. Este movimiento es el que genera el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) a través de la membrana interna y la energía electroquímica. Es el resultado de una fuerza llamada protón-motriz que impulsa la síntesis de ATP ya que los protones después fluyen pasivamente de vuelta a la matriz mitocondrial a través de un poro para protones llamado ATP sintasa (Chaban Y, et al. 2014).

La ATP sintasa es una enzima formada por dos complejos multiproteicos denominados  $F_0$  y  $F_1$ . El primero de ellos está formado por unas proteínas designadas como a, b y c. De entre ellos, cabe resaltar el papel de las 12 subunidades que conforman c porque son las encargadas de promover la rotación de una de las partes de la enzima y no están conectadas a las proteínas a y b. Por otro lado,  $F_1$  está formado por otras moléculas denominadas en letras griegas. La  $\gamma$  es la encargada de unirse al rotor formado por las subunidades c del complejo  $F_0$ . Cuando entran los protones a las subunidades c y empiezan a rotar, se provocan ciertos cambios conformacionales en las proteínas  $\beta$  de la  $F_1$  permitiendo la entrada de  $ADP + P_i$  y generando ATP (Lodish H, et al. 2005).

Dentro de todas las proteínas que forman esta cadena, el citocromo c funciona aceptando electrones del complejo III y los difunde al IV (citocromo oxidasa) que es el encargado de cederlos al oxígeno para hacer la conversión a  $H_2O$ . Como ya se describirá más adelante, el citocromo c es especialmente destacable porque es el único que puede ser liberado y fluir libremente porque no es una proteína transmembrana como los complejos. Su papel en la apoptosis es muy importante (Liu X, et al. 1996). Para la síntesis del citocromo c se genera primeramente apocitocromo c que se traduce y modifica en el citosol. A continuación es transferido al espacio intermembranal donde uno de los dominios es covalentemente anclado a la membrana para dar lugar a la forma holocitocromo c (Ow YL, et al. 2008).

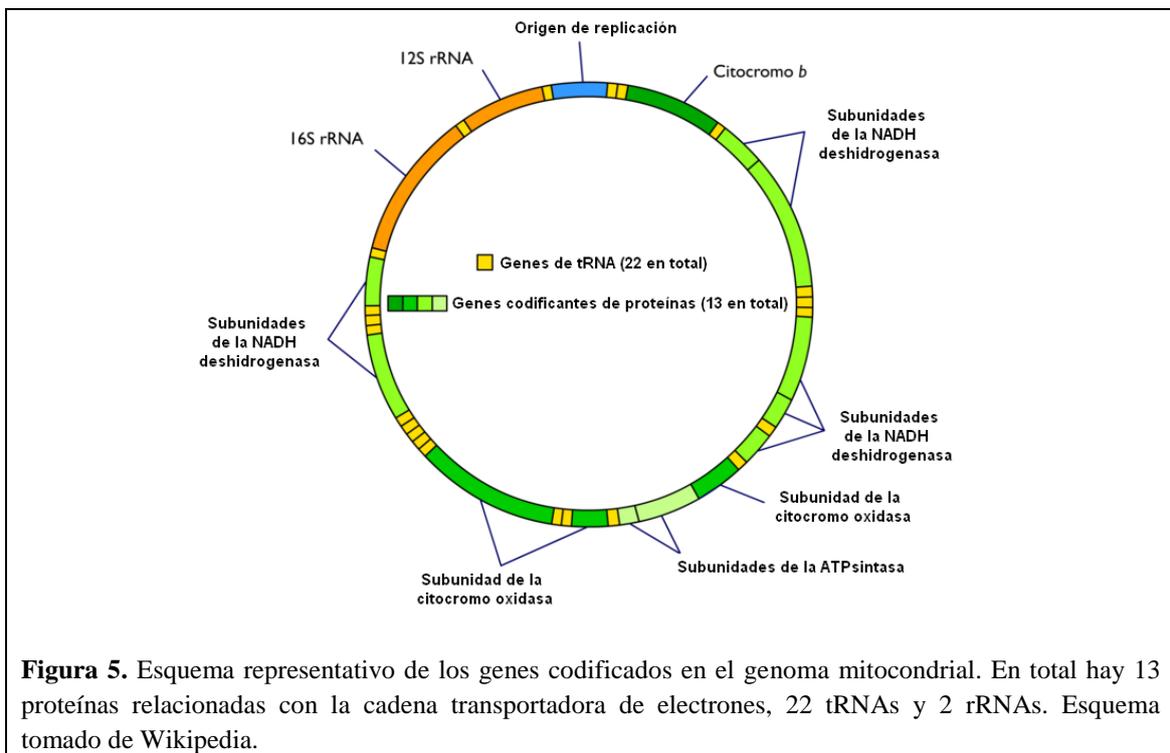


**Figura I.** Cadena respiratoria. **A)** Componentes moleculares que forman la cadena respiratoria. Los electrones son transportados desde el complejo I hasta el IV donde el oxígeno es convertido a  $H_2O$ . En tres de los cuatro complejos se liberan protones ( $H^+$ ) al espacio intermembranal que después son vueltos a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa generando, de este modo, ATP. Esquema tomado de Ow YL, et al. 2008. **B)** Estructura de la enzima ATP sintasa mostrando las subunidades estáticas y las que rotan. Esquema tomado de Lodish H, et al. 2005.

Aparte de Opa1, también se ha descrito que la proteína mitofilina puede regular la arquitectura de las crestas mitocondriales ya que su desregulación promueve alteraciones morfológicas tanto

de las crestas como de la membrana interna y aumenta la susceptibilidad a la apoptosis (John GB, et al. 2005). Mitofilina actúa en un complejo multi-proteico llamado MINOS/MitOS/MICOS desde donde actúa para mantener la estructura de las crestas. Su relevancia a nivel patológico se observó al utilizar ensayos de espectrometría de masa y demostrar que en el Síndrome de Down esta proteína se encuentra especialmente reducida (Myung JK, et al. 2003). En humanos, una organización anormal de las crestas mitocondriales se ha asociado a enfermedades como el Síndrome de Barth, el Síndrome de Leigh, al Alzheimer, a la ELA, al Síndrome de Hirschhorn y a la polimiositis (Macchi M, et al. 2012).

Las mitocondrias contienen su propio genoma, su propio ADN mitocondrial (mtDNA, por sus siglas en inglés). Una única molécula de ADN de doble hebra circular. En humanos, este genoma es de origen materno y solamente codifica 13 proteínas, 22 tRNAs y los 2 rRNAs requeridos para la traducción (**Figura 5**). Se ha calculado que los genes del resto del proteoma mitocondrial, alrededor de 1100 - 1500 proteínas, se han transferido al núcleo de la célula y, al contrario de lo que sucede en el núcleo, el 97 % del mtDNA corresponde a secuencias codificantes (Pagliarini DJ, et al. 2008). En humanos, el tamaño medio del genoma mitocondrial es de alrededor de 16,5 kb. El mtDNA más pequeño que se conoce tiene un tamaño de alrededor de 6 kb, es el de las mitocondrias de *Plasmodium falciparum* (Feagin JE, 2000). Solamente codifica para 3 proteínas y 2 rRNAs. En contrapartida, hay muchas especies de plantas terrestres donde el mtDNA se ha expandido en tamaño y alcanza una media de 200 kb. El mtDNA más grande que se conoce, con un tamaño superior a los 11000 kb, corresponde a *Silene conica*, una especie de planta con flores de la familia de las cariofiláceas (Sloan DB, et al. 2012).



La composición lipídica de las mitocondrias es muy característica. Está formada por un 50 % de fosfatidilcolina (PC), un 30 % de fosfatidiletanolamina (PE), un 10 % de fosfatidilinositol (PI), un 2 % de fosfatidilserina (PS) y un 8 % de cardiolipina (CL) (Meer G, et al. 2009). De este último, la CL, se ha destacado su contribución a la hora de establecer la forma de la membrana

---

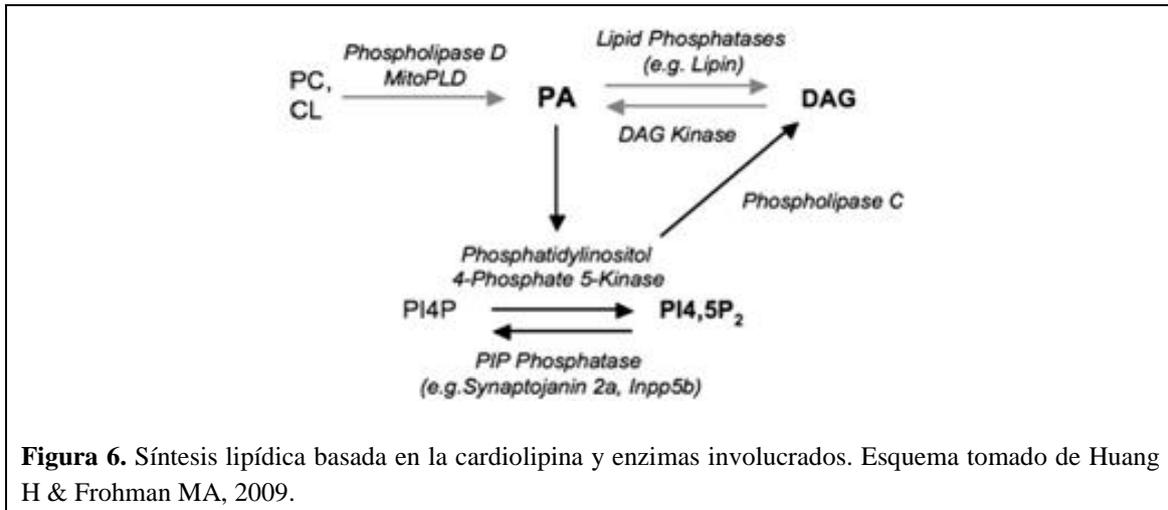
interna de las mitocondrias, donde se localice con más abundancia. Además, cabe resaltar que la CL es un lípido encontrado comúnmente en bacterias y en las células eucariotas se localiza exclusivamente en las mitocondrias (Schlame M, 2008). En mitocondrias sanas, la CL se localiza generalmente en la membrana interna de las mitocondrias donde interacciona con ciertas proteínas estabilizando las crestas y los componentes de la cadena respiratoria (Beyer K & Nuscher B, 1996) a la vez que ayuda a modular la autofagia y la muerte celular (Singh SB, et al. 2010). En relación a esto, en 2013 se publicó que la externalización de CL a la membrana externa es una señal para que esa mitocondria sea autofagocitada (Chu CT, et al. 2013). Además, cabe resaltar que la interacción de la proteína pro-apoptótica tBid con CL se ha relacionado con la reorganización de las crestas a nivel estructural (Kim TH, et al. 2004).

Antes se ha mencionado que el interior de las crestas está especializado en mantener ciertos complejos proteicos (como la cadena respiratoria) que permanecen bastante aislados del resto de componentes de la membrana interna gracias a Opa1 y las mitofilinas que son las encargadas de cerrar las crestas y aislar el contenido. Se conoce desde hace tiempo la presencia de balsas lipídicas o *Lipid Rafts* (por su nombre en inglés) en la membrana plasmática de la célula. Son zonas ricas en colesterol, lo que las hace menos fluidas, y están especializadas en concentrar o reagrupar ciertos tipos de moléculas como receptores, etc; y trasladarlos juntos por la membrana. Hace algunos años, estudiando la apoptosis, se describió que en las mitocondrias se creaban ciertas zonas especializadas donde se agrupaban gran parte de los agentes pro-apoptóticos (Malorni W, et al. 2007). Por ese entonces, se sabía que la cardiolipina era predominante en la membrana interna pero también se localizó de forma abundante en los puntos donde la membrana interna y la externa contactan. Fue un año después, en 2008, cuando se demostró por aislamiento de membrana con Triton X-100 la distribución exacta de la CL y, efectivamente, se demostró que en células donde se promovía la apoptosis, la concentración de cardiolipina aumentaba significativamente en las zonas donde también lo hacían las proteínas pro-apoptóticas como tBid (Kim TH, et al. 2004; Malorni W, et al. 2008). De modo que la CL es un constituyente esencial de estos micro-dominios funcionales que se localizan en los sitios de contacto entre ambas membranas y es desde donde se orquesta la apoptosis mediante la integración de señales que inducen la muerte (Schug ZT & Gottlieb E, 2009).

La cardiolipina es hidrolizada para formar ácido fosfatídico o PA (**Figura 6**). Esta reacción es desencadenada por la fosfolipasa D mitocondrial (MitoPLD), una proteína de la membrana externa de las mitocondrias, para promover la adherencia de las membranas de dos mitocondrias y facilitar la fusión (Choi SY, et al. 2006). El PA y el DAG pueden facilitar tanto la fusión como la fisión de los compartimentos de membrana citoplasmática en entornos específicos, por ejemplo, la endocitosis de la membrana plasmática (Lee CS, et al. 2006), la gemación de vesículas del Golgi (Bossard C, et al. 2007), la división de los peroxisomas (Guo T, et al. 2007), la inserción de vesículas de membrana en la membrana plasmática (Vitale N, et al. 2004) y la fusión de las vesículas precursoras de las membranas de la envoltura nuclear (Barona T, et al. 2005).

El análisis filogenético reveló que MitoPLD es un miembro divergente y ancestral más similar a la familia de la cardiolipina sintasa bacteriana y a Nuc, una endonucleasa bacteriana que también es miembro de la superfamilia de las fosfolipasas (Stuckey JA & Dixon JE, 1999). Su relación con la dinámica mitocondrial se demostró al comprobar que el silenciamiento de MitoPLD mediante siRNAs o formas dominante negativas promueven la fragmentación y su sobreexpresión genera una red de mitocondrias hiper-fusionadas. Además, se ha descrito la

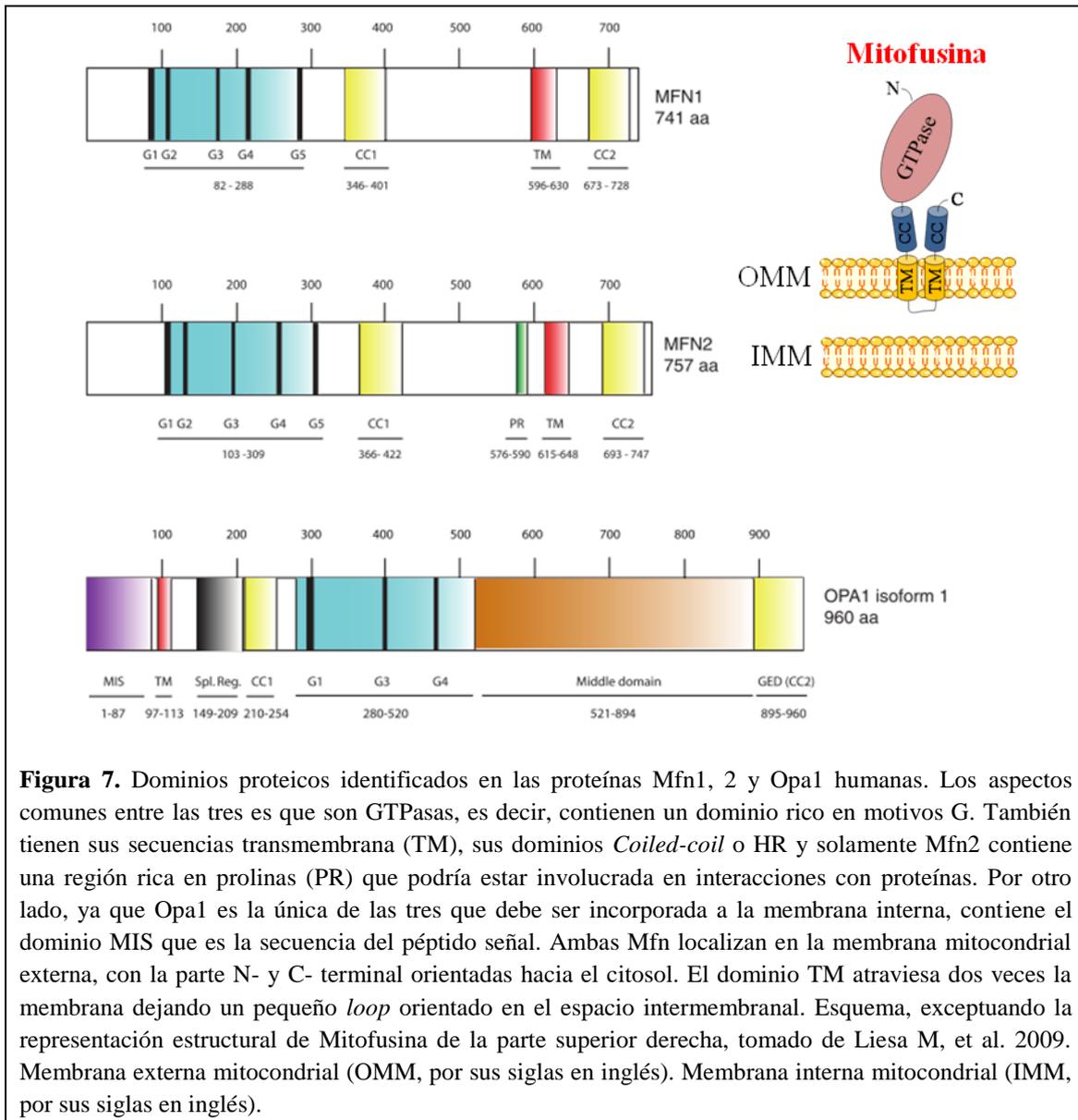
posibilidad de que interactúe con Mitofusina 2 (Mfn2), una proteína GTPasa que promueve la fusión de la membrana externa de las mitocondrias (Choi SY, et al. 2006).



Hay varios trabajos que estudian la relación de la buena regulación de las crestas mitocondriales y ciertas enfermedades asociadas. De los múltiples casos disponibles en la bibliografía, se comentará brevemente un ejemplo con la proteína PINK1 en Parkinson. Se ha demostrado que la desregulación de PINK1, una proteína que junto a Parkin se ha asociado a la enfermedad del Parkinson de origen familiar o esporádico (Valente EM, et al. 2004), da lugar a la reducción del volumen de membrana que forma las crestas y altera directamente la morfología de dichas crestas aunque los mecanismos no están bien representados (Exner N, et al. 2007).

### Proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial

Está ampliamente descrito que los cambios que se observan en la actividad de los mecanismos de fusión y fisión resultan en alteraciones del tamaño de las mitocondrias. El proceso de fusión se compone de dos pasos donde la membrana externa y la interna de las mitocondrias se fusionan por dos eventos separados. Este proceso puede explicarse gracias al hecho que las proteínas más importantes encargadas de la fusión se encuentran en localizaciones distintas en las mitocondrias. Las Mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y 2) se encuentran en la membrana externa mientras que Opa1 reside en la membrana interna. Aunque sus secuencias y estructuras proteicas se están estudiando con mucho detenimiento (**Figura 7**). El mecanismo exacto de fusión no está del todo bien definido y siguen habiendo muchas dudas sobre cómo las dos membranas se coordinan durante el proceso de fusión, qué factores proteicos intervienen en la señalización de qué zona en particular debe iniciar la unión, en primer lugar, y la fusión en sí en segundo plano y, por supuesto, cómo se distribuye el contenido entre las dos mitocondrias recién fusionadas.

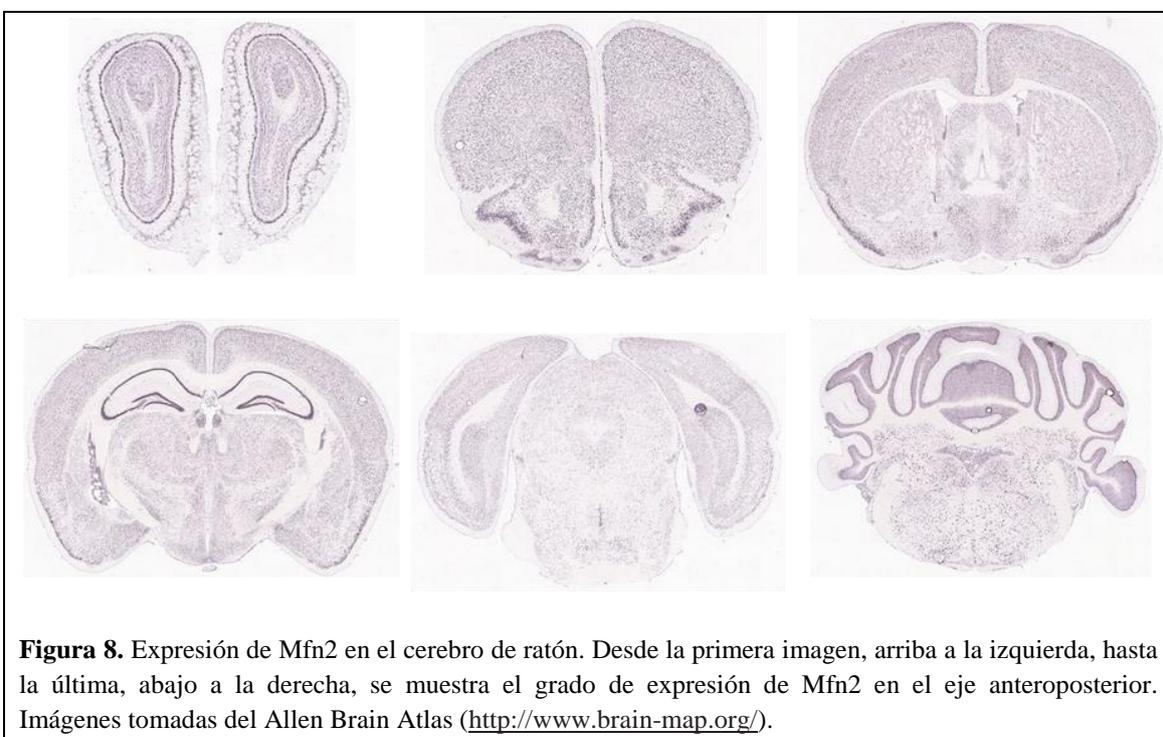


**Figura 7.** Dominios proteicos identificados en las proteínas Mfn1, 2 y Opa1 humanas. Los aspectos comunes entre las tres es que son GTPasas, es decir, contienen un dominio rico en motivos G. También tienen sus secuencias transmembrana (TM), sus dominios *Coiled-coil* o HR y solamente Mfn2 contiene una región rica en prolinas (PR) que podría estar involucrada en interacciones con proteínas. Por otro lado, ya que Opa1 es la única de las tres que debe ser incorporada a la membrana interna, contiene el dominio MIS que es la secuencia del péptido señal. Ambas Mfn localizan en la membrana mitocondrial externa, con la parte N- y C- terminal orientadas hacia el citosol. El dominio TM atraviesa dos veces la membrana dejando un pequeño *loop* orientado en el espacio intermembranal. Esquema, exceptuando la representación estructural de Mitofusina de la parte superior derecha, tomado de Liesa M, et al. 2009. Membrana externa mitocondrial (OMM, por sus siglas en inglés). Membrana interna mitocondrial (IMM, por sus siglas en inglés).

### *Mfn1* y 2

El gen humano de Mfn2 se halla en el cromosoma 1, más concretamente en el locus 1p36.22. Ambas Mitofusinas han sido identificadas en mamíferos aunque primero se describieron sus homólogos (llamados Fzo) en *Drosophila* (Hales KG & Fuller MT, 1997). Entre ellas dos existe una identidad del 63 % y comparten los mismos dominios funcionales (Santel A & Fuller MT, 2001). Cerca del extremo NH<sub>2</sub>-terminal presentan el dominio GTPasa y el *Coiled-coil* 1 o HR1. En el extremo COOH-terminal se encuentran dos dominios transmembrana y el *Coiled-coil* 2 o HR2. Los dos dominios HR son los que median el propio proceso de unión entre dos Mfns de dos mitocondrias adyacentes gracias a poder formar uniones *coiled-coil* antiparalelas entre ambas (Koshiba T, et al. 2004). Estos dímeros pueden ser homotípicos (Mfn1-Mfn1, por ejemplo) o heterotípicos (Mfn1-Mfn2). Los dominios *coiled-coil* son regiones con estructura de hélice- $\alpha$  con una periodicidad de siete aminoácidos de los cuales dos de ellos son hidrofóbicos. Estos residuos se orientan en la misma cara de la hélice de modo que pueden interactuar hidrofóbicamente con otra hélice para estabilizar una interacción proteína-proteína. El dominio

GTPasa está formado por 5 motivos G: el G1 se encarga de unir el fósforo de la molécula GTP; el G3 coordina el  $Mg^{2+}$  requerido para la hidrólisis y G1, G2 y G3 juntos forman el centro catalítico; mientras, el G4 y el G5 proporcionan la conformación específica para que solamente pueda unirse el GTP y no el ATP, por ejemplo (Bourne JT, et al. 1991). A pesar de sus similitudes, Mfn2 presenta una actividad GTPasa inferior a Mfn1 pero une el GTP con mayor afinidad (Ishihara N, et al. 2004). De forma exclusiva, Mfn2 contiene una región rica en prolinas llamada PR. Los dominios ricos en prolinas con la repetición PXX están implicados en interacciones proteína-proteína (Kay BK, et al. 2000). A nivel de tejido, el patrón de expresión de Mfn2 es más específico que el de Mfn1, aunque ambas están ampliamente expresadas (Chen H, et al. 2003), tal como se representa en la secuencia de imágenes de la **Figura 8** extraído del Allen Brain Atlas (Miller JA, et al. 2014). A pesar de conocerse toda esta información, a día de hoy no se posee todavía ninguna representación de la estructura cristalizada de las Mitofusinas en ninguna especie eucariota. La aproximación más real es una proteína descrita en bacterias que realmente podría ser la forma ancestral de Mfn y, a la vez, dar todavía más credibilidad a la teoría endosimbiótica de las mitocondrias (**BOX 2**).

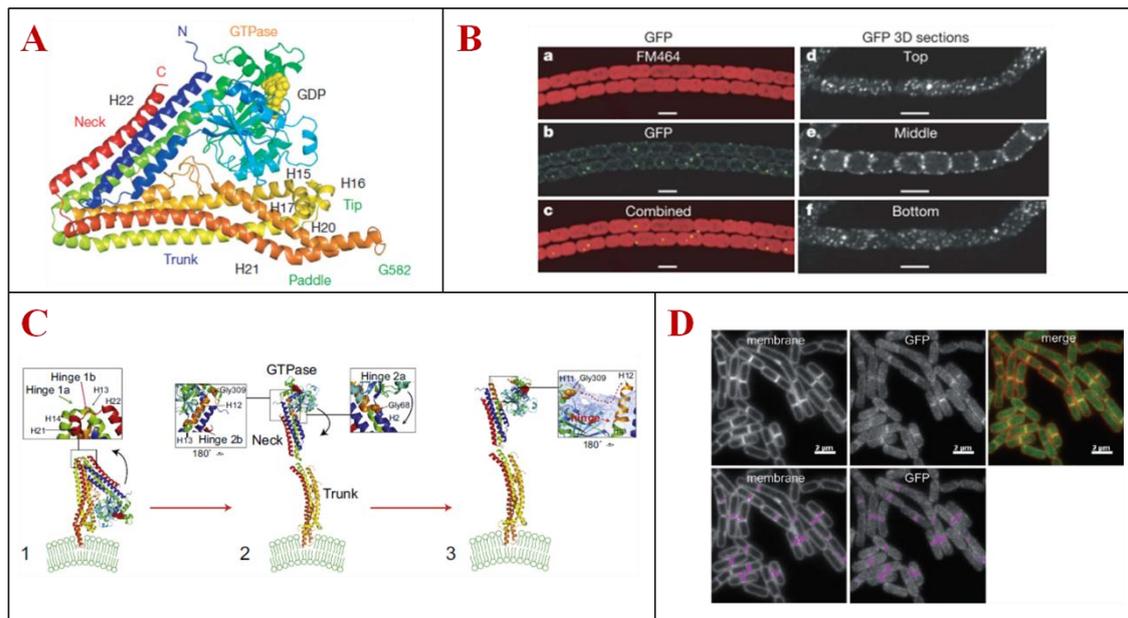


**Figura 8.** Expresión de Mfn2 en el cerebro de ratón. Desde la primera imagen, arriba a la izquierda, hasta la última, abajo a la derecha, se muestra el grado de expresión de Mfn2 en el eje anteroposterior. Imágenes tomadas del Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org/>).

#### **BOX 2** Descubrimiento de la proteína ancestral de las Mitofusinas

En 2006 se publicó en la revista *Nature* un revelador trabajo que presentaba la estructura cristalina de la proteína llamada *bacterial dynamin-like protein* (BDLP, por sus siglas en inglés). Se identificó en los filamentos de las cianobacterias de *Nostoc punctiforme* (Low HH & Löwe J, 2006) y muestran una molécula de aspecto compacto que se ancla en la membrana. Su localización se concentra en las membranas y un análisis de alineamiento de secuencias mostró que BDLP está más estrechamente emparentada (22 % de identidad y 37 % de similitud) con las proteínas dinamina, concretamente las Mitofusinas. En la BDLP encontraron también el dominio GTPasa (acción de hidrólisis del GTP), el transmembrana y algún *coiled-coil* (Low HH, et al. 2009).

El hecho de que la familia de las proteínas dinaminas de eucariotas muestre un reparto de funciones tan diverso, señala que su origen emergió en un periodo temprano de la evolución (van der Bliek AM, 1999). Hasta ahora se han localizado muchos genes que codifican para dinaminas en varias especies bacterianas que, generalmente, todas ellas se asemejan más a las Mitofusinas, como en *Bacillus subtilis* (Bürmann F, et al. 2011). Las conclusiones a grandes rasgos es que las BDLP están asociadas a la fusión de membranas en los puntos de tabicación. Estas moléculas podrían tener una conformación fusogénica, que se puede activar y desactivar. El mecanismo puede estar asociación en permitir la formación de cadenas de bacterias tipo cocos y bacilos o, incluso, permitiendo acciones tan básicas como la conjugación donde una bacteria transfiere moléculas de ADN a otra.



**Figura II.** Proteína BDLP bacteriana. **A)** Estructura cristalina de BDLP en su conformación libre de nucleótidos y asociada a GDP. La disposición de colores sigue el orden del arco iris y va desde el azul (extremo N-terminal) hasta el rojo (extremo C-terminal). **B)** La proteínas BDLP muestra un patrón punteado localizado en los filamentos de *Nostoc punctiforme*. **C)** Cambios conformacionales inducidos por el GTP sobre BDLP. **D)** La proteína BDLP de *Bacillus subtilis* se llama DynA. Aquí se muestra su localización marcada con GFP *in vivo* en los puntos de tabicación entre dos bacterias. Esquema (A, B) tomados de Low HH & Löwe J, 2006. Esquema (C) tomado de Low HH, et al. 2009. Esquema (D) tomado de Bürmann F, et al. 2011.

El proceso de fusión empieza con el acercamiento entre dos mitocondrias mediado por el dominio *coiled-coil 2* de las Mfn, formando un complejo dimérico antiparalelo mediante interacciones hidrofóbicas (Koshiba T, et al. 2004). En un segundo paso se debe producir una distorsión, posiblemente mediado por la hidrólisis de GTP, para a continuación fusionarse las membranas externas de las mitocondrias. Tanto en la fusión de la membrana externa como de la interna, mediada por Opa1, la actividad GTPasa es fundamental para completar los procesos. Mutaciones detectadas en el dominio GTPasa inhiben la fusión *in vivo* y los ensayos *in vitro* indican que la hidrólisis del GTP es esencial para la fusión (Santel A & Fuller MT, 2001; Rojo M, et al. 2002). Además de la actividad GTPasa, es necesaria la existencia de un potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) que esté en condiciones para que el proceso de fusión pueda producirse completamente (Legros F, et al. 2002; Meeusen S, et al. 2004).

---

Las Mitofusinas se hallan en la membrana mitocondrial externa, atravesándola dos veces y exponiendo los extremos N- y C- terminales hacia el citoplasma, dejando un pequeño *loop* en el espacio intermembrana (**Figura 7**) (Mozdy AD & Shaw JM, 2003). Se ha sugerido la existencia de una interacción directa o indirecta entre las Mfn y la membrana mitocondrial interna para coordinar su fusión dado que mutantes de Fzo (la forma ortóloga de Mfn en *Drosophila*) inhibe la fusión mitocondrial (Meeusen S, et al. 2004). El *loop* orientado hacia el espacio intermembranal es posiblemente el dominio que interacciona con la membrana mitocondrial interna. De hecho, la interrupción del *loop* intermembrana de Fzo inhibe la fusión mitocondrial (Fritz S, et al. 2001).

Como se ha comentado, los procesos de fusión dependen de las mitofusinas. Ratones deficientes en Mfn1 o en Mfn2 mueren durante la gestación, pero en días embrionarios distintos y mostrando diferentes patrones de fragmentación mitocondrial mientras que la sobreexpresión de cualquiera de las dos promueven un aumento de fusión (Rojo M, et al. 2002). Durante el proceso de fusión únicamente Mfn1 interacciona con Opa1 para mediar la fusión de la membrana interna (Cipolat S, et al. 2004). Curiosamente, durante la diferenciación de los cultivos primarios de neuronas hay una marcada caída en la expresión de Mfn1 y no de Mfn2 (Chang DT & Reynolds IJ, 2006). Esta observación sugiere que las neuronas requieren una menor actividad de Mfn1 durante su diferenciación y da más peso e importancia a las múltiples funciones extras que se han descrito y demostrado en Mfn2 y que no son compartidas con Mfn1:

- Es importante para el correcto desarrollo y mantenimiento del cerebelo (Chen H, et al. 2007).
- Neuronas dopaminérgicas *knockout* para Mfn2 muestran que Mfn2 es esencial para las proyecciones del estriado y el correcto funcionamiento del circuito nigroestriatal (Lee S, et al. 2012; Pham AH, et al. 2012).
- Protege las neuronas ante ROS, el daño al DNA y la excitotoxicidad (Jahani-Asl A, et al. 2007).
- Interactúa con miembros de las familias Bcl-2 anti- y pro-apoptóticas protegiendo contra la apoptosis (Karbowski M, et al. 2002; Neuspiel M, et al. 2005).
- También se localiza en la membrana del retículo endoplasmático (ER) y media la conexión con las mitocondrias (de Brito OM & Scorrano L, 2008).
- Permite la unión de las proteínas motoras de la célula a las mitocondrias facilitando su desplazamiento por los microtúbulos y su disrupción promueve la degeneración de los axones en neuronas (Baloh RH, et al. 2007; Misko A, et al. 2010; Misko AL, et al. 2012).
- Mutaciones en Mfn2 son la causa más común de padecer la enfermedad neurológica Charcot-Marie-Tooth type 2A (Züchner S & Vance JM, 2006).
- Es capaz de detener el ciclo celular al inhibir a ERK (Chen KH, et al. 2004).
- Regula el metabolismo mitocondrial al inducir la expresión y activación de los complejos I, IV y V del OXPHOS (Bach D, et al. 2003; Pich S, et al. 2005; Segales J, et al. 2013).

A nivel post-traducciona no son muchas las modificaciones descritas hasta el momento sobre Mfn2. En total son 3 fosforilaciones y una interacción proteína-proteína (**Figura 9**). Dos de las fosforilaciones van ligadas a dos vías distintas, en las que participan enzimas diferentes, que promueven la eliminación de Mfn2 a través del proteasoma. Una de ellas es la quinasa JNK que se activa ante señales de estrés genotóxico, entre otros. Al utilizar una quimioterapia genotóxica

---

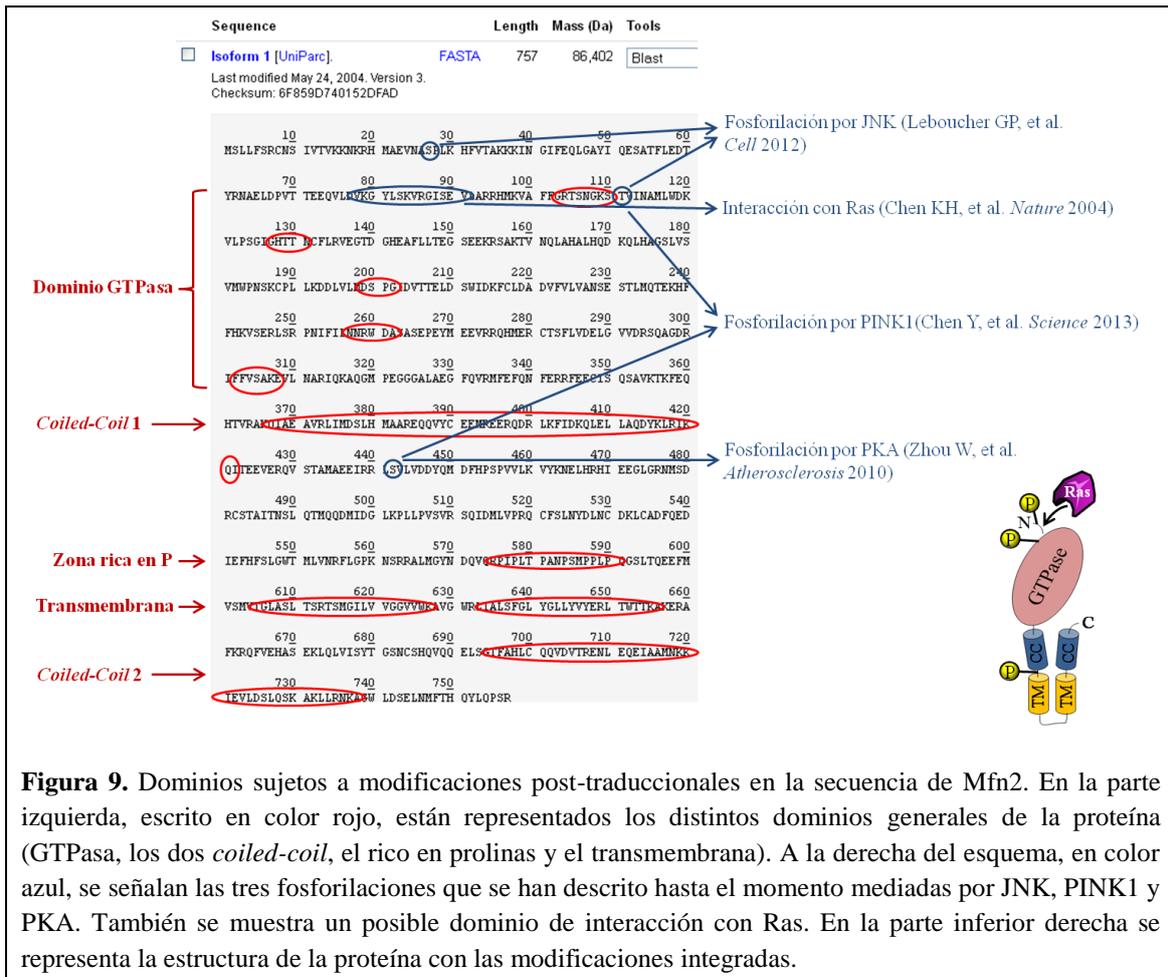
llamada doxorubicina en células de sarcoma U2OS para promover la apoptosis, detectaron que los niveles proteicos de Mfn2 descendían y se inducía la fragmentación mitocondrial (Leboucher GP, et al. 2012). Vieron que la droga provocaba la activación de JNK y ésta fosforilaba específicamente a Mfn2 en la Serina 27 que ayuda a su degradación vía proteasoma (**Figura 9**). Describieron, además, que la E3 ligasa responsable de ubiquitinar a Mfn2 era Huwe1 que actúa activando la apoptosis ante señales de estrés celular. Huwe1 es una proteína de gran tamaño con muchos sustratos que incluye múltiples dominios incluido uno homólogo al dominio 3 (BH3) de las proteínas de la familia de Bcl-2. De hecho, se cree que es a través de este dominio con el que interacciona con Mfn2, igual que otras proteínas BH3 anti-apoptóticas como Bax y Bak (Hoppins S, et al. 2011).

Otra fosforilación descrita es la promovida por la quinasa PINK1 (Chen Y & Dorn II GW, 2013). Estudios genéticos han demostrado el vínculo entre la enfermedad de Parkinson y mutaciones en los genes que codifican para una E3 ligasa, Parkin, y la quinasa PINK1 que es residente de la membrana interna de las mitocondrias (Youle RJ & Narendra DP, 2011). La funcionalidad de PINK1 va muy ligada al potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y, cuando estos valores caen, se activa, es trasladado a la membrana externa y empieza a fosforilar proteínas, entre ellas a Mfn2, para que puedan ser reconocidas por Parkin y eliminadas (Narendra DP, et al. 2010). Se sugiere que en mitocondrias despolarizadas, Mfn2 funciona como un receptor para que la proteína Parkin citoplasmática se una. Los residuos de Mfn2 descritos como dianas de fosforilación por parte de PINK1 son la Serina 442 y la Treonina 111 (**Figura 9**). De hecho, la ausencia de Mfn2 interrumpe la vía de PINK1-Parkin y promueve una morfología mitocondria anómala.

La tercera fosforilación es mediada por PKA (Zhou W, et al. 2010). El estudio se realizó en cultivos de células vasculares de musculatura lisa (VSMC) de rata y se observó que PKA fosforila a Mfn2 en el residuo de Serina 442. Desarrollaron virus que expresasen variaciones mutadas de Mfn2 en esta serina en particular y detectaron problemas a nivel de morfología mitocondrial. PKA cuando es reclutado a la membrana externa de la mitocondria vía AKAP1 puede fosforilar también a Drp1 e inhibirla (Cribbs JT & Strack S, 2007).

Por último, hay varias líneas de evidencias que respaldan el papel que Mfn2 ejerce a nivel regulador sobre el ciclo celular (Chen KH, et al. 2004). El mecanismo propuesto es que Mfn2 puede frenar la progresión del ciclo al unir y secuestrar a Ras, inhibiendo así la vía de señalización Raf-MEK1/2-ERK1/2. El motivo de interacción con Ras se encuentra entre los aa 77-92, ya que la eliminación de esta secuencia imposibilita la inhibición de ERK1/2 que está en la vía de activación de Ras. En resumen, podemos remarcar que Mfn2 podría estar jugando un papel anti-proliferativo.

A pesar de los avances en la descripción de la regulación a nivel transcripcional y proteica de Mfn2 todavía hay gran cantidad de funciones que desencadena esta proteína para las que no se conoce el mecanismo. A continuación se ha pretendido hacer un resumen de factores/enzimas que de alguna forma u otra regulan a Mfn2 en todos sus niveles (por supuesto, habrán otros).



**Figura 9.** Dominios sujetos a modificaciones post-traduccionales en la secuencia de Mfn2. En la parte izquierda, escrito en color rojo, están representados los distintos dominios generales de la proteína (GTPasa, los dos *coiled-coil*, el rico en prolinas y el transmembrana). A la derecha del esquema, en color azul, se señalan las tres fosforilaciones que se han descrito hasta el momento mediadas por JNK, PINK1 y PKA. También se muestra un posible dominio de interacción con Ras. En la parte inferior derecha se representa la estructura de la proteína con las modificaciones integradas.

Dentro del grupo de las enzimas E3 ligasas que actúan en la vía de degradación de Mfn2 por el proteasoma, hay Parkin y Huwe1 de las cuales ya se ha hablado. Otra proteína que se describió en 2012 fue Mul1 (Lokireddy S, et al. 2012). Mul1 actúa en la vía de señalización de los factores de transcripción FoxO1/3 muy vinculados a la síntesis de factores relacionados con la autofagia como LC3, Bnip3, Atg7, etc (Mammucari C, et al. 2007). De hecho, FoxO se ha asociado con la disrupción de la funcionalidad y la organización de las mitocondrias (Romanello V, et al. 2010). La implicación de Mul1 en la degradación de Mfn2 se describió en células de músculo esquelético donde su sobreexpresión aumentaba la fragmentación, despolarización y eliminación de las mitocondrias mediante mecanismos de mitofagia tanto *in vitro* como *in vivo* (Lokireddy S, et al. 2012). La otra E3 ligasa es MARCH-V, una proteína que se está empezando a escarbar en sus funciones biológicas (Lehner PJ, et al. 2005). Su sobreexpresión promueve la formación de mitocondrias largas y tubulares de una forma dependiente de Mfn2. Por otro lado, formas mutadas de MARCH-V causan fragmentación (Nakamura N, et al. 2006). Parece ser que esta E3 ligasa es capaz de unirse tanto con Mfn2 como con Drp1 modulando sus actividades pero solamente ubiquitina a Drp1. De hecho, como se ha comentado, un aumento de los niveles de MARCH-V conlleva un aumento de la fusión debida a su interacción con Mfn2. De las 4 enzimas E3 ligasas descritas, solamente esta última se ha demostrado que juega un papel importante en la promoción de la fusión mitocondrial mientras que las otras conllevan fragmentación al marcar Mfn2 para su eliminación vía proteasoma.

---

Entrando en un grupo específico de inhibidores, están las proteínas MIB, ALCAT1, Vpr y Opa3. Sobre esta última ya se hablará más adelante cuando se describan varios procesos de fisión que son independientes de Drp1. La proteína MIB fue descrita en 2006 (Eura Y, et al. 2006). Es un miembro de la familia de las proteínas reductasas de media cadena. Se expresa de forma general en todos los tejidos y su localización celular es generalmente citoplasmática aunque parcialmente puede encontrarse en la membrana externa de las mitocondrias. También mostraron que MIB afecta específicamente la morfología de las mitocondrias y de ningún otro orgánulo como el ER, el Golgi o los peroxisomas. La sobreexpresión de MIB induce fisión mientras su silenciamiento aumenta la fusión. El dominio por el cual interactúa con Mfn1 y, probablemente, Mfn2 no es conocido todavía aunque MIB coimmunoprecipita con ambas.

La cardiolipina (CL), como se ha comentado con anterioridad, es un fosfolípido clave para las mitocondrias requerido para la fosforilación oxidativa y es sensible a los aumentos incontrolados de ROS que conllevan su oxidación durante la apoptosis (Kagan VE, et al. 2005). ALCAT1 es una aciltransferasa identificada como catalizador para eliminar la CL en respuesta al estrés oxidativo durante la diabetes y la obesidad generando problemas a nivel mitocondrial (Li J, et al. 2010). Hace poco tiempo, su vinculación con la mitocondria se expandió al demostrarse su papel más directo en la regulación de la dinámica mitocondrial y el bien estar del mtDNA al actuar directamente sobre Mfn2 (Li J, et al. 2012). Mostraron que la sobreexpresión de ALCAT1 producía una caída de más del 70 % de los niveles de mRNA y de un 50 % de los de proteína de Mfn2 promoviendo fragmentación mitocondrial. Esta fisión puede restablecerse al sobreexpresar Mfn2. Los problemas observados en el mtDNA podrían estar ligado a la necesidad de tener una Mfn2 plenamente funcional (Chen H, et al. 2010). De modo que ALCAT1 podría estar participando en una vía de regulación de la dinámica mitocondrial a partir de Mfn2 ante situaciones de gran producción de ROS relacionado con enfermedades del envejecimiento.

El último inhibidor es Vpr una proteína viral del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1, por sus siglas en inglés). Esta proteínas media el arresto del ciclo celular, daña al DNA y promueve la apoptosis (Emerman M & Malim MH, 1998). El mecanismo de acción de Vpr es formar un canal iónico mediante su segmento hidrofóbico penetrando la bicapa lipídica (Piller SC, et al. 1996). En un reciente estudio se demostró que, tras su infección, la proteína Vpr expresada por el HIV-1 se ubicaba en el retículo endoplasmático, en las membranas de asociación entre el retículo y las mitocondrias (MAM, por sus siglas en inglés) y en la propia membrana externa de las mitocondrias (Huang CY, et al. 2012). Además, vieron que Vpr causa una pérdida del potencial de membrana mitocondrial al reducir de forma post-transcripcional la expresión de Mfn2 mientras que otras proteínas como Mfn1 y Drp1 no veían afectados sus niveles proteicos. No se sabe exactamente como, también promueve la traslocación de Drp1 al interior del núcleo. La caída de los niveles de Mfn2 describieron que se originaban por la degradación de la proteína vía proteasoma. No aseguran qué enzima E3 liagasa es la responsable aunque hay evidencias de la activación de CUL4 y DCAF1 (Casey L, et al. 2010).

En el grupo de los activadores encontramos a p53, el famoso factor de transcripción tan ampliamente estudiado en cáncer (Levine AJ, 1997). Es un factor activador con muchos genes diana, se han calculado entre 200 – 400 (Deiry WS, et al. 1992). Su implicación con la apoptosis va vinculada a la multitud de genes que regula como Bax, Noxa, Puma, Bcl-2, etc (Johnstone RW, et al. 2002). En relación con la dinámica mitocondrial, se ha identificado una secuencia de unión de p53 al promotor de Mfn2 (Wang W, et al. 2010). La sobreexpresión de p53 aumenta la

---

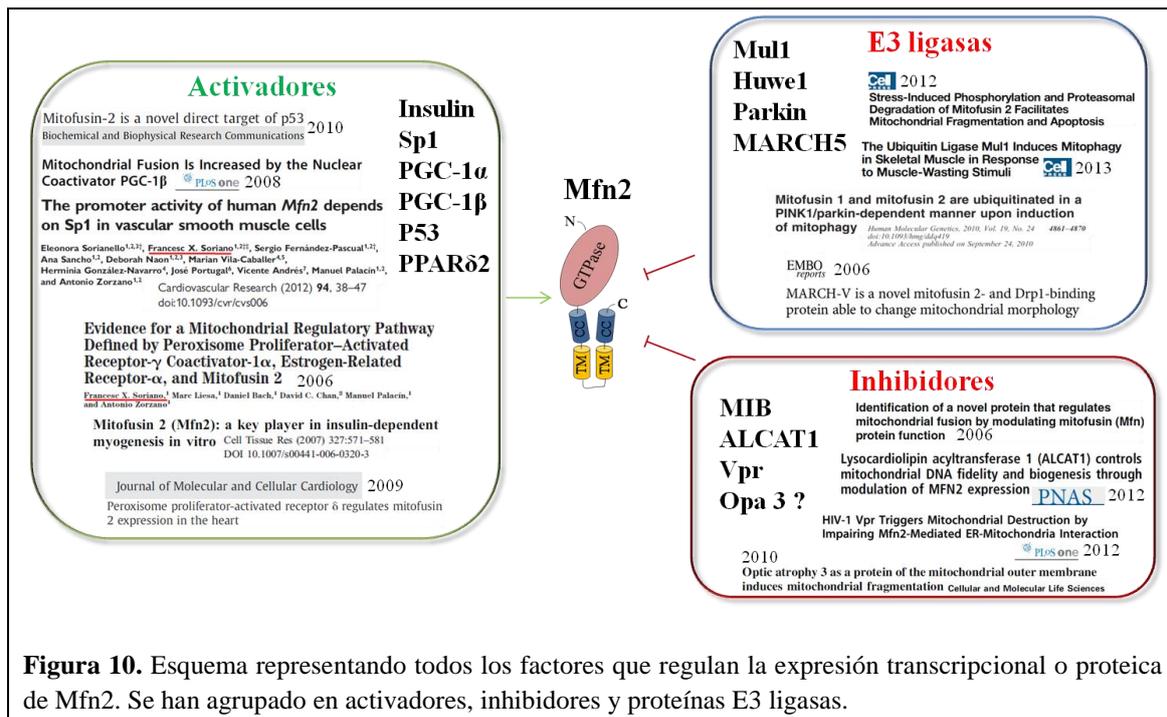
expresión de Mfn2 mientras que su silenciamiento con siRNA promueve una caída. A pesar de la relevancia de la información y lo importante que parece ser conectar Mfn2 con un factor de transcripción tan estudiado como p53, no se han elaborado más trabajos destacables.

Otro factor de transcripción recientemente detectado como regulador del promotor de Mfn2 en células vasculares de músculo liso, es el Sp1 (Soriano E, et al. 2012). Identificaron una región ubicada en -229/-54 del promotor de Mfn2 altamente rica en sitios de unión para Sp1. La importancia de estos resultados muestran que la sobreexpresión de Sp1 aumenta la actividad del promotor de Mfn2, el silenciamiento de Sp1 hace el efecto contrario, el efecto activador de Sp1 sobre Mfn2 puede ser inhibido utilizando drogas específicas y Sp1 también se une *in vivo* al promotor de Mfn2.

El PGC-1 $\alpha$  y  $\beta$  son reguladores positivos de la actividad y biogénesis mitocondrial en músculo esquelético (Arany Z, et al. 2007). Se vio que su sobreexpresión aumenta la expresión de múltiples proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial como Mfn2, Mfn1, Opa1, Drp1, Fis1, etc; siendo Mfn2 la que sufre los cambios más exagerados (Liesa M, et al. 2008). Lo que observaron es que se requiere la presencia de Mfn2 para que PGC-1  $\beta$  pueda inducir cambios al promover la fusión mitocondrial. No hay datos sobre esta regulación en neuronas. Por otro lado, hay evidencias de la regulación directa de Mfn2 por parte de PGC-1 $\alpha$  en diabetes tipo 2 dando a entender parte de las alteraciones mitocondriales que se desencadenan en dicha enfermedad (Soriano FX, et al. 2006a).

Bajo condiciones normales se ha calculado que los cardiomiocitos contienen más de 1000 mitocondrias (Marin-Garcia J, 2005). En cardiomiocitos de ratón se describió que PPAR $\delta$  regulaba la expresión de Mfn2 controlando la homeostasis energética del miocardio (Li Y, et al. 2009). Localizaron que PPAR $\delta$  se une específicamente a la región denominada PPRE del promotor de Mfn2 ya que su sobreexpresión aumenta los niveles de Mfn2 mientras que células deficientes para PPAR $\delta$  hacen bajar la expresión de Mfn2. En términos generales, los niveles de expresión de Mfn2 van muy sujetos al estatus energético del corazón por lo que su regulación mediada por PPAR $\delta$  puede abrir la puerta a nuevas vías de regulación de Mfn2 para mantener un dinámica mitocondrial y un metabolismo energético correcto en el corazón.

En 2012 se llevó a cabo un estudio fenotípico para identificar que mutaciones eran las más predominantes en las enfermedades vinculadas a Mfn2 de la población española. Como se ha comentado, mutaciones en Mfn2 es la causa principal de sufrir Charcot-Marie-Tooth type 2 (CMT2) (Züchner S & Vance JM, 2006). Hasta el momento se han identificado alrededor de 45 mutaciones vinculadas a CMT2. En la población española, mutaciones en Mfn2 es la forma más frecuente de sufrir CMT2, concretamente la Arg468His (Casasnovas C, et al. 2012). En otras poblaciones como la coreana, solamente un 24,2 % de las CMT2 son causadas por mutaciones en Mfn2 y en América es de 3 de cada 13 familias con la enfermedad (Casasnovas C, et al. 2012).



**Figura 10.** Esquema representando todos los factores que regulan la expresión transcripcional o proteica de Mfn2. Se han agrupado en activadores, inhibidores y proteínas E3 ligasas.

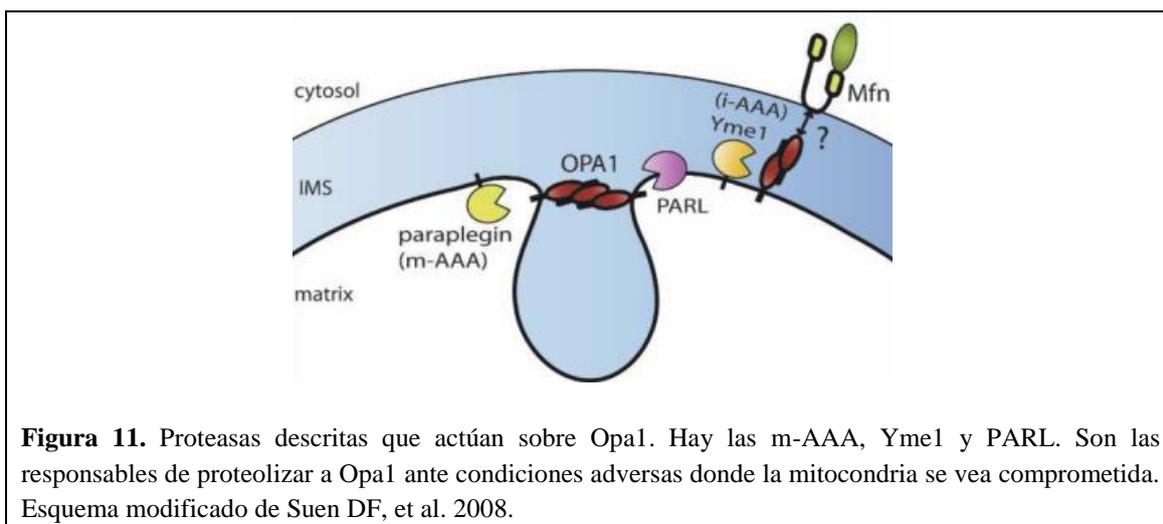
## Opa1

La proteína Opa1 está codificada en el cromosoma 3, concretamente en la región 3q28-q29 (Liesa M, et al. 2009). Sus funciones, de gran importancia para las mitocondrias, se han asociado al control de la fusión de la membrana interna, la morfología de las crestas y el mantenimiento y estabilidad del mtDNA (Cipolat S, et al. 2004; Amati-Bonneau P, et al. 2008). A pesar de ser una proteína encontrada en todos los tejidos, es muy abundante en la retina, el cerebro, los testículos, el hígado, el páncreas, el corazón y el músculo esquelético (Alexander C, et al. 2000). Opa1 es residente de la membrana interna de las mitocondrias y es allí donde desempeña sus funciones. Igual que las Mfn, es una proteína GTPasa, tiene un dominio transmembrana y dos *coiled coil* (Figura 7). En el extremo C-terminal posee el dominio GED que está vinculado a la oligomerización y a la activación de proteínas dinaminas (Praefcke GJ & McMahon HT, 2004). De hecho, es posible que este dominio GED sea el encargado de promover la interacción entre Opa1 y Mfn1.

Mgm1 es una GTPasa localizada en el espacio intermembrana en levaduras cuya mutación provoca fragmentación mitocondrial (Wong ED, et al. 2000). Se ha demostrado la interacción de Fzo con Mgm1 y con Ugo1, otra proteína mitocondrial localizada en la membrana mitocondrial externa y cuyos mutantes se caracterizan por presentar mitocondrias fragmentadas (Sesaki H & Jensen RE, 2001). Ensayos de co-inmunoprecipitación muestran que la asociación Fzo-Mgm1-Ugo1 parece ser transitoria, esto sugiere que estas proteínas sólo se asocian en los complejos de fusión activos para disociarse después de la fusión (Sesaki H & Jensen RE, 2004). Ugo1 no parece estar conservada en mamíferos, pero Mgm1 tiene un homólogo humano al que se le llama Opa1 (Olichon A, et al. 2002). Es una proteína localizada en la membrana interna, como ya se ha dicho, aunque en otro trabajo se la localiza en el espacio intermembrana e, incluso, en la membrana externa (Satoh M, et al. 2003). El hecho de que en levaduras haya interacciones entre Fzo-Mgm1-Ugo1, hace plantearse si en mamíferos pueda existir la misma interacción, directa o mediada por una proteína aún por descubrir. La existencia de este tipo de

interacciones ayudará a entender el mecanismo por el cual las proteínas Fzo (Mfn) participan en la fusión de la membrana mitocondrial interna.

Durante la transcripción de Opa1 hay una seria regulación por *splicing* alternativo que da lugar a unas 8 isoformas distintas. El control sobre Opa1 en las mitocondrias se da vía proteasas ubicadas en la misma membrana interna. Estas se activan ante la inducción de la apoptosis, la disipación del potencial de membrana y la fragmentación de las mitocondrias. Este control por proteolización podría sugerir que las isoformas largas son capaces de interaccionar y promover la fusión mientras que las cortas se ven incapacitadas (Duvezin-Caubet S, et al. 2006). Hasta la fecha se han descrito tres proteasas distintas que median la proteólisis de Opa1 generando productos de distinta longitud: la proteasa m-AAA (orientada a la matriz mitocondrial), la Yme1 (orientada al espacio intermembranal) y PARL que actúa en la membrana interna (**Figura 11**). Yme1 y la familia de las m-AAA, de la cual forma parte la paraplegina, son metaloproteasas que cortan a Opa1 en condiciones de pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Griparic L, et al. 2007). Por otro lado, la acción de PARL es la generación de una isoforma soluble de Opa1 detectada en el espacio intermembranal. Esta isoforma es la encargada de controlar la forma de las crestas mitocondriales independientemente de su función en la fusión (Cipolat S, et al. 2006). También se ha descrito una metaloproteasa que se ha vinculado directamente a los cambios en el  $\Delta\Psi_m$ , OMA1 (Head B, et al. 2009).



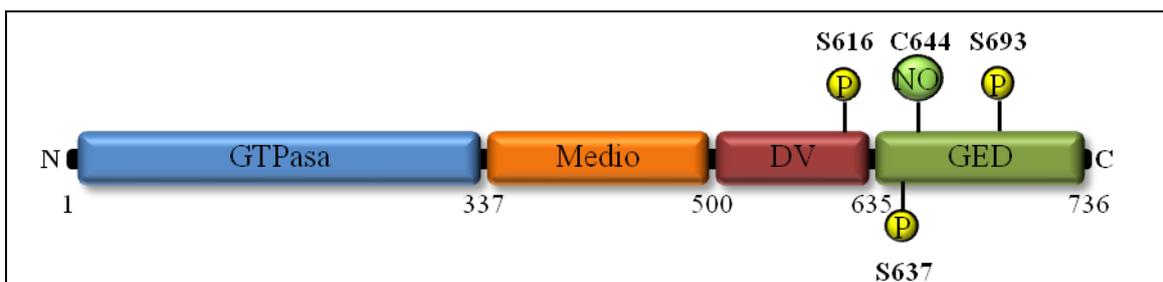
En relación a la excitotoxicidad y la fragmentación mitocondrial que comporta, la sobreexpresión de Opa1 es suficiente para recuperar la morfología mitocondrial y proteger las neuronas. Parece que la proteasa calpaina, que se activa ante subidas excesivas de calcio, podría estar promoviendo la proteólisis de Opa1 contribuyendo a la muerte neuronal seguida a un insulto isquémico (Jahani-Asl A, et al. 2011).

### *Drp1*

A diferencia del mecanismo de fusión, el proceso de fisión tiene mediante un mecanismo diferente, implicando incluso a otros orgánulos de la célula, y la maquinaria en sí es la misma que la utilizada en la fragmentación de los peroxisomas (Koch A, et al. 2003). La proteína encargada de fisurar ambos orgánulos es la GTPasa citoplasmática Drp1. Su expresión es general en todos los tejidos aunque en el cerebro se expresa una isoforma específica generada

por *splicing* alternativo (Smirnova E, et al. 1998). Drp1 es una proteína complicada de estudiar y compleja de entender. A nivel de modificaciones post-traduccionales, Drp1 puede ser fosforilada, ubiquitinizada, SUMOilada, nitrosilada y O-GlcNAcilada (Otera H, et al. 2013). Además, se ha comprobado su función como mediador en la formación de vesículas (Imoto M, et al. 1998), como controlador de la morfología del retículo endoplasmático (Yoon Y, et al. 1998) y la morfología mitocondrial (Smirnova E, et al. 1998). En la fisión mitocondrial se describió al inicio que el receptor de Drp1 en la mitocondria era Fis1 (Lackner LL & Nunnari JM, 2009), aunque ahora se apunta a otros posibles candidatos (tal como se describirá en el siguiente apartado).

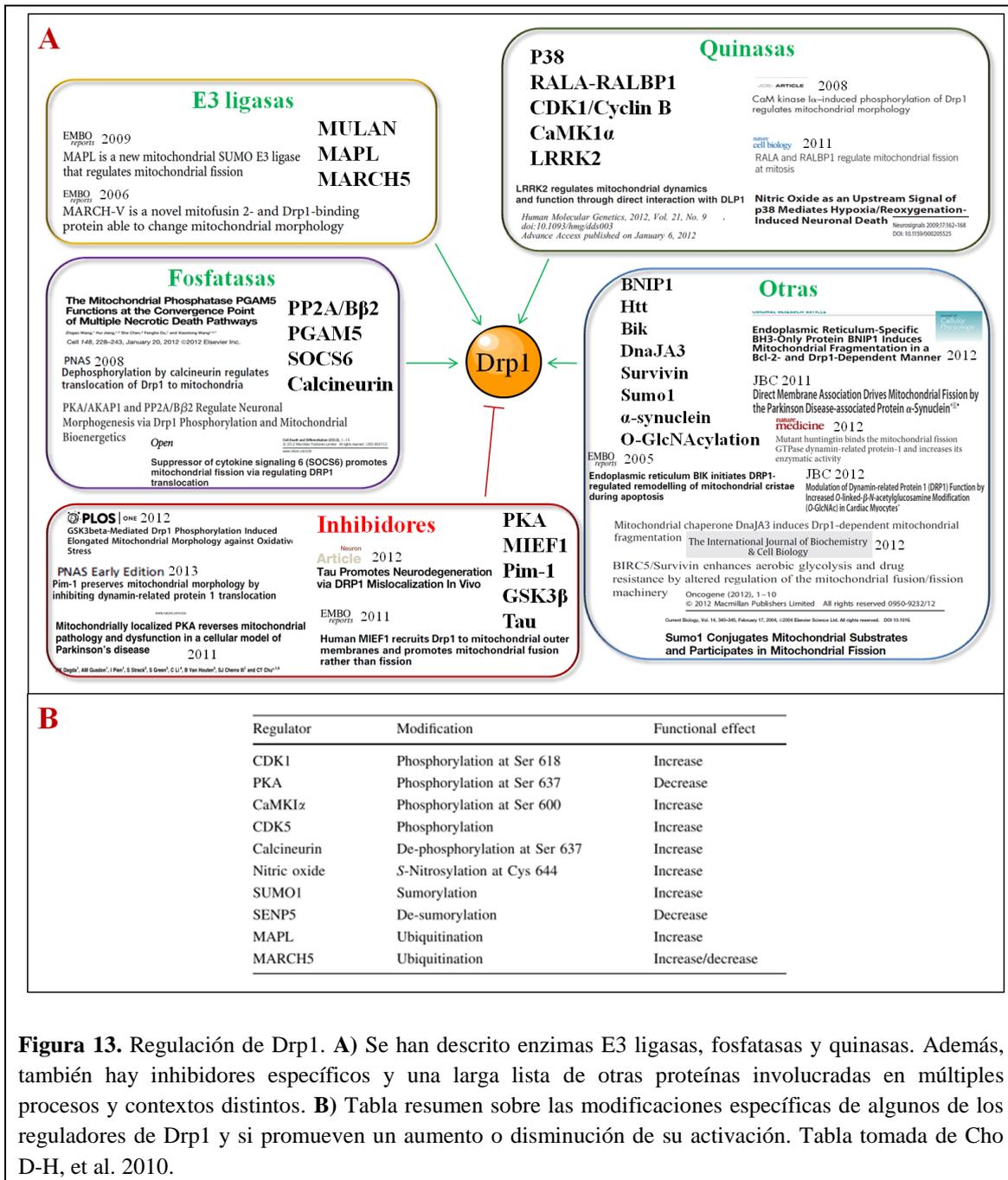
Drp1 es una proteína generalmente citoplasmática a pesar de que también se detecta en mitocondrias, concretamente en puntos precisos donde se dará una futura fisión. La estructura de la proteína se compone de cuatro dominios: el GTPasa, el cuerpo medio, el variable (DV) y el GED (**Figura 12**). El dominio GTPasa está formado por 3 motivos G y es el encargado de la reordenación de la proteína tras su activación y genera la fuerza que conduce a la constricción de las membranas. El dominio GED es crucial para la regulación de la actividad GTPasa y para las asociaciones intra- e intermoleculares. EL DV no se inserta en la membrana plasmática, aunque se ha demostrado su papel crucial en el reclutamiento de Drp1 a la mitocondria y el proceso de fisión (Liesa M, et al. 2009; Ford MG, et al. 2011).



**Figura 12.** Dominios estructurales de la proteína Drp1. Desde el extremo N-terminal al C-terminal encontramos el dominio GTPasa, el medio, el variable (DV) y el GED. Se han representado también las tres fosforilación conocidas en las serinas 616, 637 y 693 (humanos) y la nitrosilación que se localiza en la cisteína 644. Drp1 también puede ser ubiquitinizada, SUMOilada y O-GlcNAcilada, aunque los residuos modificados no se conocen bien.

Los modelos murinos KO de Drp1 mueren alrededor del día 12,5 de gestación con un alto desarrollo de anomalías, particularmente en el prosencéfalo. Ratones con una variante KO específica para la isoforma de Drp1 de las neuronas, llegan a nacer pero mueren rápidamente por neurodegeneración (Ishihara N, et al. 2009). Neuronas deficientes para Drp1 presentan una distribución anormal de mitocondrias tubulares en diferentes zonas de la célula como las neuritas. Esto inhibe la aportación de ATP desde las mitocondrias al conjunto de la célula y las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular se elevan. En su conjunto, los distintos sucesos acaban provocando la muerte de la célula (Otera H, et al. 2013).

En la **Figura 13** se presenta un esquema sobre las enzimas que participan en la modulación de la función de Drp1. Los factores participantes son numerosos y están vinculados a muchas enfermedades y patologías distintas.



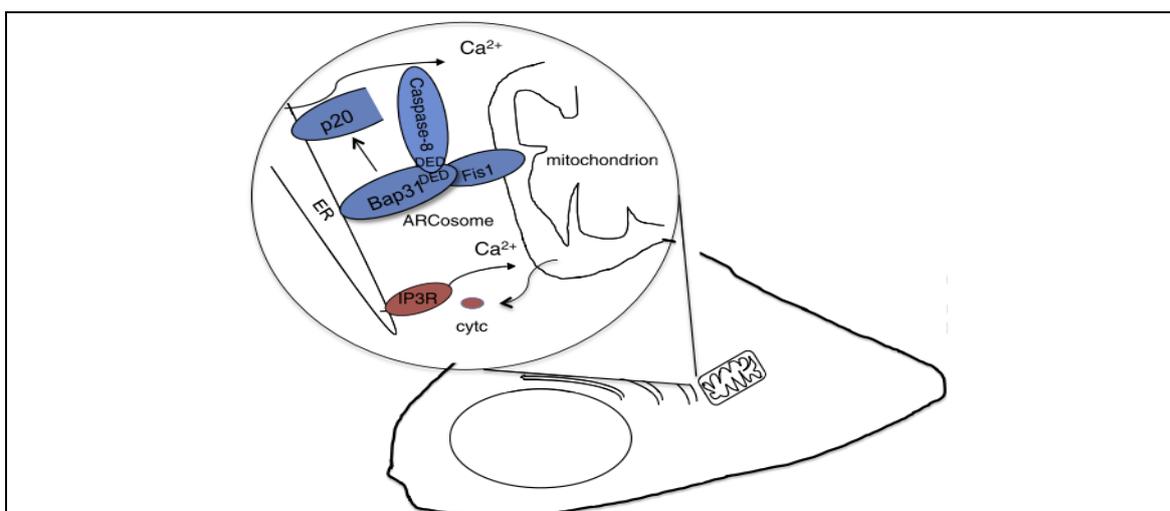
**Figura 13.** Regulación de Drp1. **A)** Se han descrito enzimas E3 ligasas, fosfatasa y quinasas. Además, también hay inhibidores específicos y una larga lista de otras proteínas involucradas en múltiples procesos y contextos distintos. **B)** Tabla resumen sobre las modificaciones específicas de algunos de los reguladores de Drp1 y si promueven un aumento o disminución de su activación. Tabla tomada de Cho D-H, et al. 2010.

### *Fis1 / Mff / MIEF1 o MiD51 & MiD49*

Fis1 es una proteína de la membrana externa de las mitocondrias y siempre se ha descrito como el posible receptor de Drp1 por las funciones que se han estudiado en la proteína ortóloga en levaduras (Lackner LL & Nunnari JM, 2009). El tamaño de Fis1 es de unos 17 kDa, es una proteína pequeña. Parece que su inserción en la membrana externa no sigue ningún patrón común. Sorprendentemente parece depender de la composición lipídica de la membrana externa ya que el aumento en la concentración de ergosterol inhibe su inserción (Kemper C, et al. 2008). La estructura proteica de Fis1 se compone de un dominio transmembrana y 6 hélices  $\alpha$ , algunas de las cuales forman dos dominios TRP implicados en la interacción proteína-proteína (Liesa M, et al. 2009).

La proteína Mff fue identificada por el laboratorio de Alexander M. van der Blik en una búsqueda en la librería de iRNAs de *Drosophila* para encontrar agentes responsables de provocar alteraciones en la morfología mitocondrial (Gandre-Babbe S & van der Blik AM, 2008). Es una proteína de la membrana externa de las mitocondrias que actúa como receptor de Drp1 a la mitocondria. Hasta el momento siempre se había pensado que Fis1 de humanos era el receptor por antonomasia de Drp1 ya que en levaduras se había estudiado como tal (Lackner LL & Nunnari JM, 2009). Pero este trabajo cambió el paradigma. De hecho, el silenciamiento de Mff utilizando iRNA induce una morfología tubular en las mitocondrias. Contrariamente, su sobreexpresión provoca fragmentación y un aumento en el reclutamiento de Drp1 que se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Otera H, et al. 2010). Este reclutamiento por Mff parece estimular la actividad GTPasa de Drp1 mientras que no parece serlo por Fis1 (Otera H & Mihara K, 2011).

Entonces, ¿qué función desencadena Fis en humanos? Se ha observado que la sobreexpresión de Fis1 provoca fragmentación mitocondrial pero estas observaciones deben tomarse con cautela porque, a veces, la sobreexpresión de proteínas de membrana puede desencadenar un estrés no fisiológico a las células obligando a sufrir cambios morfológicos en las mitocondrias. Por otro lado, la caída en la expresión de Fis1 induce una red mitocondrial tubular (Yoon Y, et al. 2003). A pesar de que el papel de Fis1 en la fisión mitocondrial sigue estando vigente, hace pocos años se describió otra posible función vinculada a la interacción entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático. Fis1 podría estar transmitiendo una señal de apoptosis desde la mitocondria hacia el RE a través de su interacción con Bap31 del RE (Iwasawa R, et al. 2010; Grimm S, 2012). Esta interacción facilitaría que Bap31 fuese cortada por la procaspasa 8 para transformarla en su forma activada p20Bap31. Esta forma es la causante de transmitir rápidamente una señal para que el ER libere calcio hacia la mitocondria, seguramente en las MAM. Este aumento repentino de calcio estimula el reclutamiento de Drp1, la fisión de las mitocondrias y la liberación del citocromo c (**Figura 14**). Es importante remarcar que la organización entre orgánulos a nivel fisiológico media la transmisión de lípidos y calcio entre el RE y las mitocondrias. Formando esta unión entre ambos orgánulos se encuentran las Mfn2 (de Brito OM & Scorrano L, 2008).



**Figura 14.** Interacción de Fis1-Bap31 ante un estímulo apoptótico. Ante una infección vírica, la acumulación de ROS y distintos tipos de señales de estrés, es cuando esta interacción se establece y

---

promueve la liberación de calcio por parte del RE hacia la mitocondria. Esto facilita la liberación del citocromo c. Esquema tomado de Grimm S, 2012.

Aparte de lo comentado, Fis1 sigue despertando el interés y su vinculación con la morfología mitocondrial sigue siendo muy cierta. TBC1D15 y 17 son dos proteínas GAP encargadas de desactivar la enzima GTPasa Rab. Son factores importantes en la morfología de mitocondrias y peroxisomas (Yamano K, et al. 2014) ya que son reclutadas vía Fis1 (Onoue K, et al. 2013). Su movimiento hacia las mitocondrias es una señal de daño mitocondrial y se promueve la formación de la autofagia. Ante mitocondrias dañadas, PINK1 envía una señal a Parkin para que ésta pueda reclutar las proteínas que son necesarias para la formación del autofagosoma. Todo apunta a que Fis1 podría tener un papel destacado en la mitofagia al reclutar a TBC1D15 porque facilitan la unión de las moléculas LC3 que se encuentran en las membranas que serán utilizadas de mitofagosomas, en este caso (Yamano K, et al. 2014).

MIEF1 (también llamada MiD51) es una proteína de la membrana externa de las mitocondrias que expone su extremo C-terminal al citosol. Aunque es una proteína ampliamente representada en vertebrados no se han detectado homólogos en levadura, invertebrados ni plantas. Sorprendentemente, MIEF1/MiD51 ha resultado ser un receptor mitocondrial para Drp1 pero, a diferencia de todos los demás, su función es reclutarlo e inhibirlo (Zhao J, et al. 2011; Palmer CS, et al. 2011). Su sobreexpresión promueve la fusión de las mitocondrias pero dando lugar a una morfología distinta a la que observamos al sobreexpresar Mfn2 (no interaccionan entre ellas) y su reducción promueve fragmentación. Además, el mecanismo por el que MIEF1 media el reclutamiento de Drp1 independientemente de si Drp1 está activada o no y parece ser totalmente independiente a lo que ocurra con Fis1 y Mff (Zhao J, et al. 2013). Sobre la regulación de MIEF1 no se conoce nada aunque puede formar oligómeros, lo que indica un cierto grado de activación. Además, es capaz de interactuar fuertemente con Fis1 aunque se desconoce la función. Quizás está vinculada con la autofagia ya que la sobreexpresión de MIEF1 aumenta la producción de factores como LC3 pero no es capaz de frenar o inhibir la progresión de la apoptosis.

A pesar de todo, la información disponible es, en algunos casos, contradictoria. Hay un estudio que muestra que un doble *knockdown* contra ambas MiD resulta en mitocondrias tubulares y reduce el reclutamiento de Drp1 (Palmer CS, et al. 2011). Pero, paradójicamente, su sobreexpresión también causa elongación de las mitocondrias y el *knockdown* de MiD51/MIEF1 causa fragmentación (Zhao J, et al. 2011). A raíz de esta discrepancia, otro trabajo elaborado en células MEF mostró que la sobreexpresión de ambas MiD aumentaba el reclutamiento de Drp1 y también su fosforilación inhibitoria en el residuo de Serina 637, la cual se reducía al hacer caer el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). La conclusión a la que llegan los autores es que tanto MiD49 como MiD51/MIEF1 reclutan a Drp1 para promover la fisión mitocondrial y que este reclutamiento podría ser una forma de mantener a Drp1 en la membrana externa en modo inactivo hasta que alguna señal promoviera la fisión (Losón OC, et al. 2013).

El mecanismo o contexto por el que Drp1 es reclutado a uno u otro de estos receptores mitocondriales descritos no se conoce. Igual que tampoco se tienen evidencias de que tipo de modificaciones post-traduccionales dirigen a Drp1 hacia uno u otro lado para promover fisión o fusión mitocondrial.

---

## Mecanismo de fusión y fisión

“Granules can be seen to fuse together into rods or chains, and these elongate into threads, which in turn anastomose with each other and may unite into a complicated network, which in turn may again break down into threads, rods, loops and rings” (Lewis MR & Lewis WH, 1914).

Estas fueron las primeras palabras que se registraron y publicaron en 1914 en la revista *Science* donde se describe con elegancia la fusión y fisión mitocondrial. En esos tiempos, mucho antes incluso de la invención del microscopio electrónico, unos ojos entrenados y profesionales fueron capaces de ver un fenómeno sin parangón. Un fenómeno que a día de hoy, 100 años más tarde, trae a la comunidad científica de cabeza intentando esclarecer su regulación, su relación con los demás orgánulos de la célula y su vinculación con la apoptosis. Es interesante resaltar que todas estas investigaciones y todo lo que se va a comentar a continuación sobre la dinámica mitocondrial, son fenómenos ocurridos en metazoos y hongos, ya que en plantas, los mecanismos involucrados no se conocen bien (Arimura S & Tsutsumi N, 2002; Arimura S, et al. 2004; Scott I, et al. 2006; Carrie C, et al. 2013)

El auge en la investigación de la dinámica mitocondrial se ha producido en los últimos 20 años cuando se ha visto lo importante que es para la comprensión de muchos procesos biológicos tales como el mantenimiento de las funciones mitocondriales, la apoptosis y el envejecimiento celular (Detmer SA & Chan DC, 2007). Son muchos los genes que se han identificado relacionados con la fusión y fisión, siendo el FzO de *Drosophila melanogaster*, la proteína homóloga a Mfn, la primera de ellas en 1997 (Hales KG & Fuller MT, 1997).

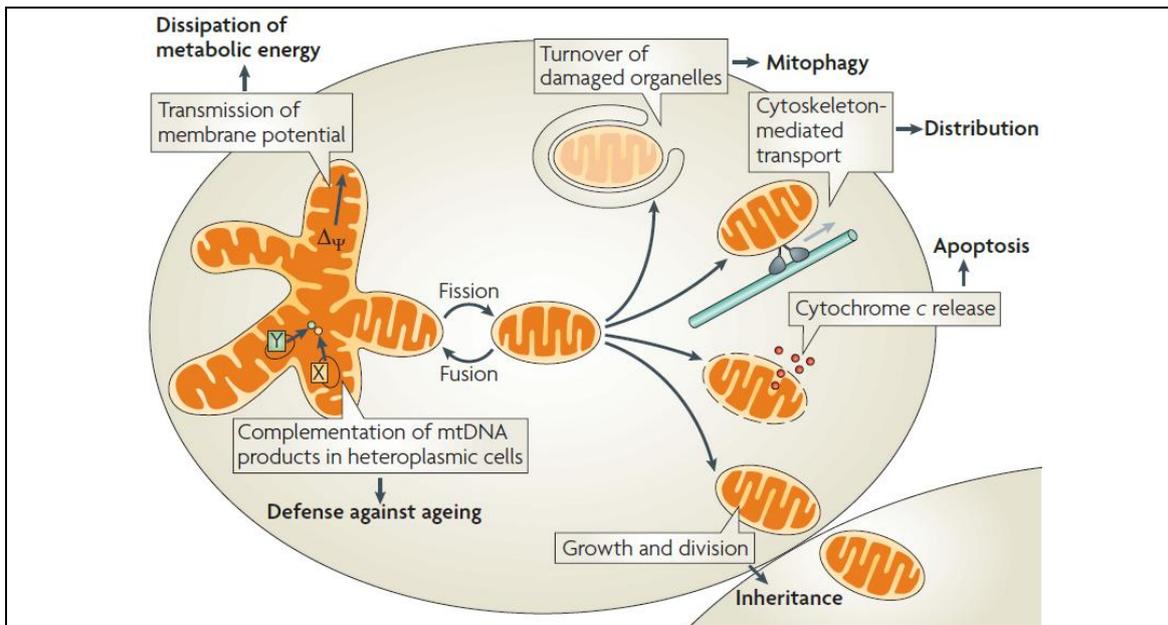
La mayoría de los orgánulos de la célula pueden generarse de nuevo a excepción del retículo endoplasmático y las mitocondrias que deben proliferar mediante el crecimiento y la división de los orgánulos pre-existentes. Tal como se esquematiza en la **Figura 15**, la fusión entre mitocondrias promueve el intercambio de contenido entre una y otra. Este proceso es muy importante para disipar la energía generada por un incremento del potencial de membrana mitocondrial, para intentar paliar la acumulación de mutaciones en el mtDNA y para disminuir o diluir algún aumento repentino de radicales libres de oxígeno (Westermann B, 2010; Chan DC, 2012).

De forma antagónica, la fisión mitocondrial promueve la división de un orgánulo generando dos nuevos (**Figura 15**). Este proceso permite a la célula distribuir y reorganizar su compleja red de mitocondrias para adaptarla a las necesidades que van variando (Knott AB, et al. 2008). Durante la división celular, los orgánulos se fisianan para generar mitocondrias más pequeñas que pueden ser más fácilmente repartidas entre las dos células hijas (Taguchi N, et al. 2007). Durante la distribución de las mitocondrias por todo el interior de la célula, cabe resaltar que unos orgánulos más pequeños pueden ser más fácilmente repartidos y enviados a los puntos donde se requiere su función. La correcta regulación de la distribución mitocondrial es vital en tipos celulares grandes o largos como las neuronas que presentan un árbol dendrítico de gran tamaño y un axón largo para hacer las sinapsis (Li Z, et al. 2004).

Un acontecimiento clave en la apoptosis es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial que libera el citocromo c y otros factores pro-apoptóticos desde el espacio intermembrana al citosol para desencadenar la apoptosis (Suen DF, et al. 2008). La apoptosis y

su *link* con la fisión mitocondrial se describió en mamíferos por primera vez en 2001 y se vio que el proceso es mediado por un evento previo de semi-fisión que involucra la proteína Drp1, la principal encargada de la fisión mitocondrial (Frank S, et al. 2001).

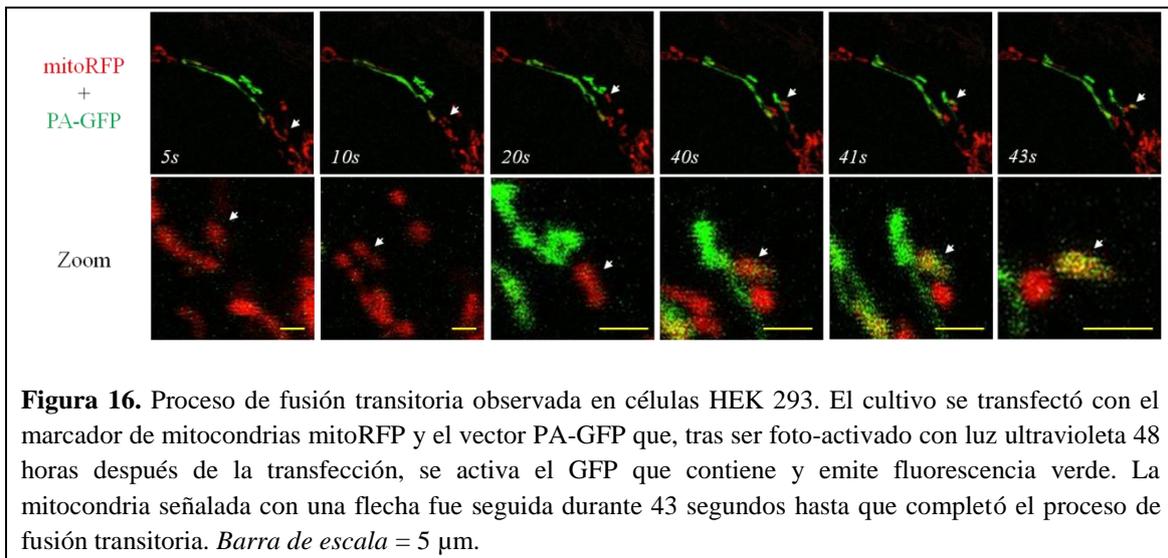
La autofagia de las mitocondrias se denomina mitofagia y constituye un mecanismo para eliminar las mitocondrias disfuncionales de la célula y por lo tanto prevenir la proliferación de mtDNA mutado. Este proceso, la fisión de las mitocondrias es vital para poder crear orgánulos más pequeñas y ser eliminados por autofagia de forma más sencilla (Twig G, et al. 2008).



**Figura 15.** Funciones biológicas de los procesos de fusión y fisión mitocondrial. La dinámica mitocondrial es un mecanismo extremadamente controlado. La fusión es un proceso importante para disipar la energía metabólica y defender contra el envejecimiento por la acumulación de ROS. Por otro lado, la fisión facilita muchos procesos esenciales para la célula como la división, la mitofagocitosis, la distribución de mitocondrias y la apoptosis. Esquema tomado de Westermann B, 2010.

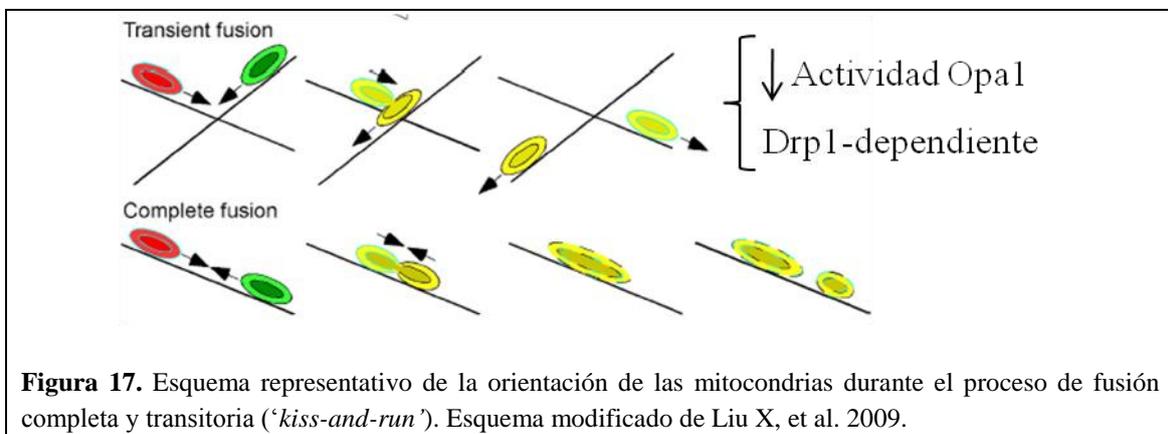
La dinámica mitocondrial no puede estudiarse por igual en todos los tipos celulares por culpa del factor tiempo. Un tiempo que se expresa en segundos en la mayoría de líneas celulares y en minutos o incluso horas en cultivos primarios de neuronas. Las mitocondrias en las neuronas se encuentran muy bien distribuidas por todo su interior: soma neuronal, árbol dendrítico, axón y terminal sináptico. Una superficie tan grande es muy difícil de cubrir si las mitocondrias no estuviesen bien situadas, por lo tanto, el movimiento o desplazamiento de estos orgánulos no es muy detectable en períodos cortos de tiempo. En el laboratorio hemos desarrollado experimentos de observación de mitocondrias en neuronas vivas por la técnica de microscopía confocal *live cell imaging*. Lo que hemos podido sacar como conclusión es que, en un estado basal, las mitocondrias tubulares y alargadas son bastante estáticas, desplazándose muy ligeramente en dirección anterógrada o retrógrada, y en ocasiones se ven otras mitocondrias de menos tamaño que rápidamente pasan circulando por el interior de una dendrita. Con esta técnica nos dispusimos a utilizar un plásmido llamado PA-GFP que codifica para una proteína de la matriz mitocondrial que expresa GFP solamente después de ser foto-activada (irradiada) con luz ultravioleta. Para poder apreciar más finamente y en poco tiempo la fusión mitocondrial, trabajamos con células HEK 293 transfectadas con un vector RFP para marcar mitocondrias y el

PA-GFP. Sin hacer nada, las mitocondrias se ven todas rojas, pero después de irradiar una zona de la célula, las mitocondrias que allí se encuentran se vuelven verdes al activarse el GFP. Pudimos trabajar en una escala temporal de segundos y el resultado se muestra en la **Figura 16**. Fuimos capaces de seguir una mitocondria no activada desde el momento 0 segundos hasta el segundo 43 donde completó un proceso de fusión transitoria (los tipos de fusión se explicarán a continuación) donde una mitocondria roja y otra verde intercambian material y la roja queda marcada de color amarillo. En otro experimento idéntico que desarrollamos, no mostrado aquí, todas las mitocondrias de la célula se habían vuelto amarillas en menos de 10 minutos.



En 2009, un grupo de investigación de Boston publicó unos resultados donde utilizaban por primera vez la expresión ‘*kiss-and-run*’ de forma muy elocuente para diferenciar el mecanismo de fusión transitorio del completo que se esquematiza en la **Figura 17** (Liu X, et al. 2009).

- La fusión completa se da cuando dos mitocondrias que viajan por el mismo microtúbulo se encuentran de frente y su fusión es completa (membrana externa e interna) generando una sola mitocondria más larga.
- En el caso de la transitoria, esta se ejecuta por dos mitocondrias que viajan por microtúbulos distintos y su fusión solo permite el intercambio de material ya que cada una sigue después su camino. Este tipo de fusión se ha asociado a un mantenimiento y reciclado de metabolitos entre mitocondrias favoreciendo las reacciones metabólicas.



---

Una diferencia esencial entre ambos mecanismos es que la transitoria permite que las mitocondrias mantengan su topología original mientras que en la completa se genera un nuevo orgánulo con topologías diferentes. Teniendo en cuenta que la fusión transitoria es rápida en el tiempo, no sería muy efectiva a la hora de intercambiar proteínas de membrana e incluso moléculas de mtDNA, ya que se ha descrito que estos procesos requieren de algo más de tiempo (Legros F, et al. 2004).

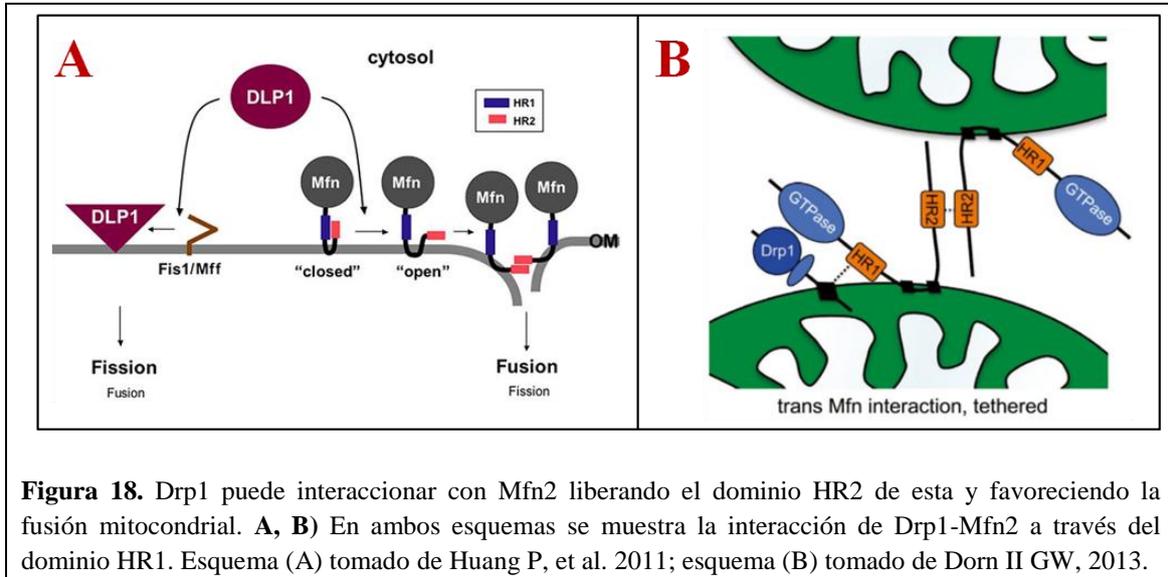
Las proteínas implicadas en ambos procesos son exactamente las ya descritas (Mitofusinas y Opa1). La diferencia principal entre ambos mecanismos es a nivel de membrana interna, es decir, en la acción de Opa1. Los autores del trabajo (Liu X, et al. 2009) detectaron que en la fusión transitoria el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) descendía ligeramente en comparación con la completa. En relación a esto, se ha descrito que la caída del  $\Delta\Psi_m$  facilita el procesamiento de Opa1 por parte de algunas proteasas (Ishihara N, et al. 2006; Song Z, et al. 2007). Con este argumento se podría defender que, según las condiciones de las mitocondrias, se genera un tipo u otro de fusión en el que participa o no la Opa1.

Opa1 es proteolizada por varias proteasas, una de ellas es la Yme1L (Song Z, et al. 2007). La caída de los niveles de Yme1L se ha asociado con un aumento de la fragmentación mitocondrial y también de la fusión transitoria o '*kiss-and-run*'. Además, se promueve el aumento de los niveles proteicos de MiD49 y Mff en las mitocondrias, dos receptores de Drp1 (Ruan Y, et al. 2013).

Es importante remarcar que la separación de ambas mitocondrias durante una fusión transitoria depende de Drp1 y podría estar influenciada por el hecho de que las proteínas motoras que unen cada mitocondria a su microtúbulos correspondiente, siguen haciendo fuerza y desplazándolas promoviendo la fisión. De hecho, en células COS7 e INS1, se ha calculado que cada 24 minutos se genera una fusión y 1,3 minutos después tiene lugar una fisión (Twig G, et al. 2008). Esto demuestra que algo que ocurre durante el proceso de fusión debe inducir o promover poco después un proceso de fisión. En la fusión transitoria podría ocurrir algo parecido. El rápido reclutamiento de Drp1 y la promoción de la fisión durante un mecanismo de fusión transitoria podría deberse a una interacción directa entre Drp1 y Mfn2.

Efectivamente, hace pocos años se describió por primera vez la posibilidad de que las dos proteínas con funciones totalmente antagónicas interaccionaran entre ellas para favorecer la fusión mitocondrial (**Figura 18**). El proceso de fusión en sí requiere una interacción homotípica (Mfn2-Mfn2) o heterotípica (Mfn2-Mfn1) mediante Mitofusinas de mitocondrias adyacentes a través del dominio HR2 (*coiled-coil*) más cercano al extremo c-terminal (Koshiba T, et al. 2004). Los dominios HR1 y HR2 de una Mfn se inhiben entre ellos al interaccionar o si forman dímeros con otras Mfn de la misma mitocondria, inhabilitando el proceso de fusión. Cuando Drp1 es reclutada a la mitocondria puede interaccionar con el dominio HR1 de una Mfn2 (más cercano al dominio GTPasa) permitiendo la exposición del HR2 que podrá interactuar con el de otra Mfn de una mitocondria adyacente y promover la fusión (Huang P, et al. 2011). Esta no es la primera vez que se describe la interacción directa entre Mfn2 y otra proteína no mitofusina: se conoce la unión con Bax y Bak (Karbowski M, et al. (2006) y las proteínas E3 ubiquitin ligasas Parkin (Chen Y, et al. 2013), Huwe1 (Leboucher GP, et al. 2012) y Mul1 (Lokireddy S, et al. 2012).

Para terminar se describirá una molécula llamada M1 que promueve la fusión mitocondrial (Wang D, et al. 2012). Los autores desarrollaron un *screening* masivo de muchos posibles compuestos químicos para encontrar alguno que promoviese la fusión. El más activo de todos fue el compuesto hidrazona M1. Demostraron que su aplicación funcionaba a la hora de restablecer la morfología mitocondrial en células KO para Mfn1 o Mfn2. Además, promovía la síntesis de ATP y disminuía la apoptosis aumentando la supervivencia al incrementar la fusión mitocondrial.



### *Fisión independiente de Drp1*

El control de la fisión mitocondrial, igual que el de la fusión, son mecanismos muy sensibles que deben ser regulados con mucho tacto. El desbarajuste de algún miembro de la maquinaria puede conducir a una hiper-fusión o, por el contrario, a una fragmentación excesiva que active la apoptosis. Por tanto, la regulación de las principales proteínas encargadas de la dinámica mitocondrial, como las Mitofusinas, Opa1 y Drp1, debe ser controlada finamente.

Aunque es bien conocido el papel de Drp1 en la fisión mitocondrial, recientemente han aumentando los trabajos que apuntan a vías de fisión mitocondrial independientes de Drp1. Es decir, tipos celulares o situaciones específicas donde se ha analizado la fragmentación de las mitocondrias y se ha demostrado que Drp1 no participa en ellas. En algunos casos, como veremos a continuación, los trabajos se han centrado en otros protagonistas que posiblemente sean nuevas moléculas que, directa o indirectamente, influyen en la dinámica mitocondrial de una forma que escapa al modelo general.

Hace algunos años se describió el vínculo de la proteína Opa3 en ratones, de la cual no se conocen homólogos en otras especies ni la función biológica exacta, con algunas enfermedades parecidas a las de Opa1, la atrofia óptica hereditaria dominante, cataratas y el Síndrome de atrofia óptica de Costeff (Reynier P, et al. 2004). Más adelante se presentaron resultados que demostraban que Opa3 es una proteína de la membrana externa de las mitocondrias y promueve la fragmentación de una forma que parece ser independiente de Drp1 ya que la utilización de la forma dominante negativa de Drp1 no tiene efectos sobre el papel de Opa3 (Ryu SW, et al. 2010). Describen como la transfección de células HeLa con Opa3 WT o alguna forma que

---

contiene una mutación detectada en pacientes, promueve la fragmentación y sensibiliza la célula a la apoptosis solamente ante ciertos estímulos apoptóticos ya que de por sí la sobreexpresión de Opa3 no induce el reclutamiento de Bax a la mitocondria, la liberación de citocromo c ni la activación de la caspasa 3. De forma contraria, el silenciamiento de Opa3 conduce a una morfología tubular promoviendo la fusión. Los autores afirman tener datos preliminares sobre la posible interacción de Opa3 con las mitofusinas a nivel inhibitorio. Aparte de este trabajo, no hay mucha más información disponible que nos ilustre sobre el funcionamiento de la proteína, a pesar de que nosotros hemos realizado algunos experimentos al respecto en neuronas (ver el apartado de Resultados).

Otro ejemplo que se ha descrito sobre fisión independiente de Drp1 es mediante la toxina llamada listeriolisina O (LLO) de las bacterias *Listeria monocytogenes* (Hamon MA, et al. 2012). Se ha observado que LLO induce la fragmentación de las mitocondrias siguiendo una vía totalmente distinta a lo descrito con anterioridad ya que no incluye la participación de ciertos componentes de la dinámica mitocondrial como Drp1 y Opa1 (Stavru F, et al. 2013). También detectaron que esta toxina promovía la caída de los niveles proteicos de Mff a través de una vía no encontrada, consistente con resultados de otros grupos (Ribert D, et al. 2010).

En líneas generales, el tamaño de la red mitocondrial de una célula depende del balance entre fusión y fisión. Ambos procesos actúan de forma antagónica y decantarse hacia uno u otro depende directamente de la concentración de proteínas (Sesaki H & Jensen RE, 1999). La proteína humana TMEM11 y su forma ortóloga en *Drosophila*, PMI, forman parte de la membrana interna de las mitocondrias. Las primeras observaciones fueron que tanto la pérdida de función de PMI como de TMEM11 promueven la pérdida de tubularidad de las mitocondrias y éstas se vuelven más esféricas. Aparece una condensación importante en la red mitocondrial (mantienen un aspecto de esferas muy grandes y largas), demostrando su función como agente pro-fisión o anti-fusión (Rival T, et al. 2011). Las teorías que se barajan es que PMI/TMEM11 podrían actuar como proteínas de “tubulación”, no fusión. Es decir, estarían controlando el diámetro de las mitocondrias al regular la longitud de las crestas (Macchi M, et al. 2012).

Por último cabría hablar también de MTP18 descrita como proteína reguladora de la morfología mitocondrial (Tondera D, et al. 2004). Al parecer, aunque no está nada claro ya que solamente hay 3 artículos disponibles en la bibliografía sobre esta proteína, MTP18 podría estar actuando por si sola promoviendo la fisión o participando como una proteína que ayuda a Drp1 a cumplir su función. Tanto su sobreexpresión como su inhibición provocan cambios en la morfología mitocondrial (Tondera D, et al. 2005). Además, MTP18 es necesaria para que Fis1 induzca la fisión. Más recientemente se ha especulado que su función podría estar más relacionada con la fisión de la membrana interna de las mitocondrias y que podría estar regulada por PINK1 (Gispert S, et al. 2009).

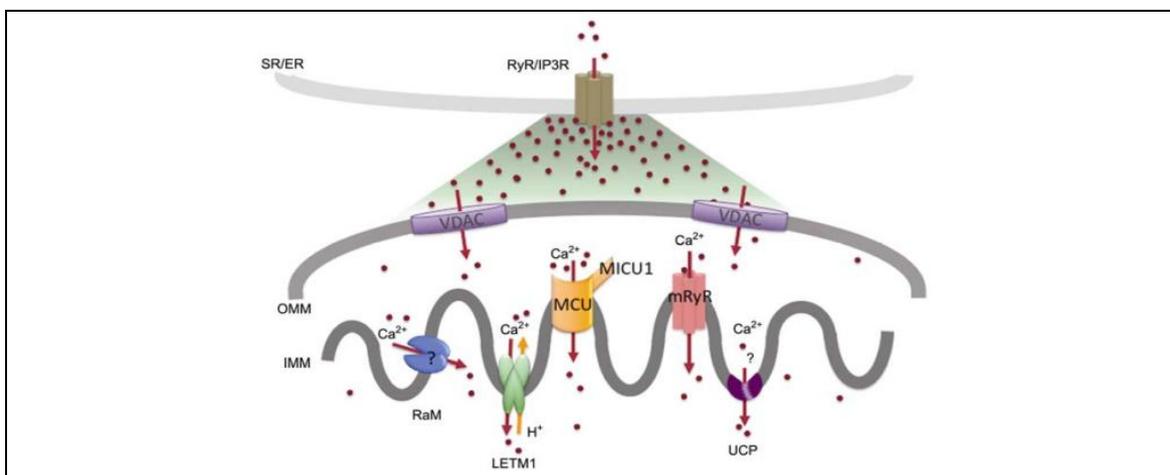
## **Comunicación entre orgánulos**

Dentro de la célula los orgánulos se encuentran en continua comunicación e interacción entre ellos. No solamente los que pertenecen al sistema conectado por vesículas, sino también al resto.

*Unión con el retículo endoplasmático*

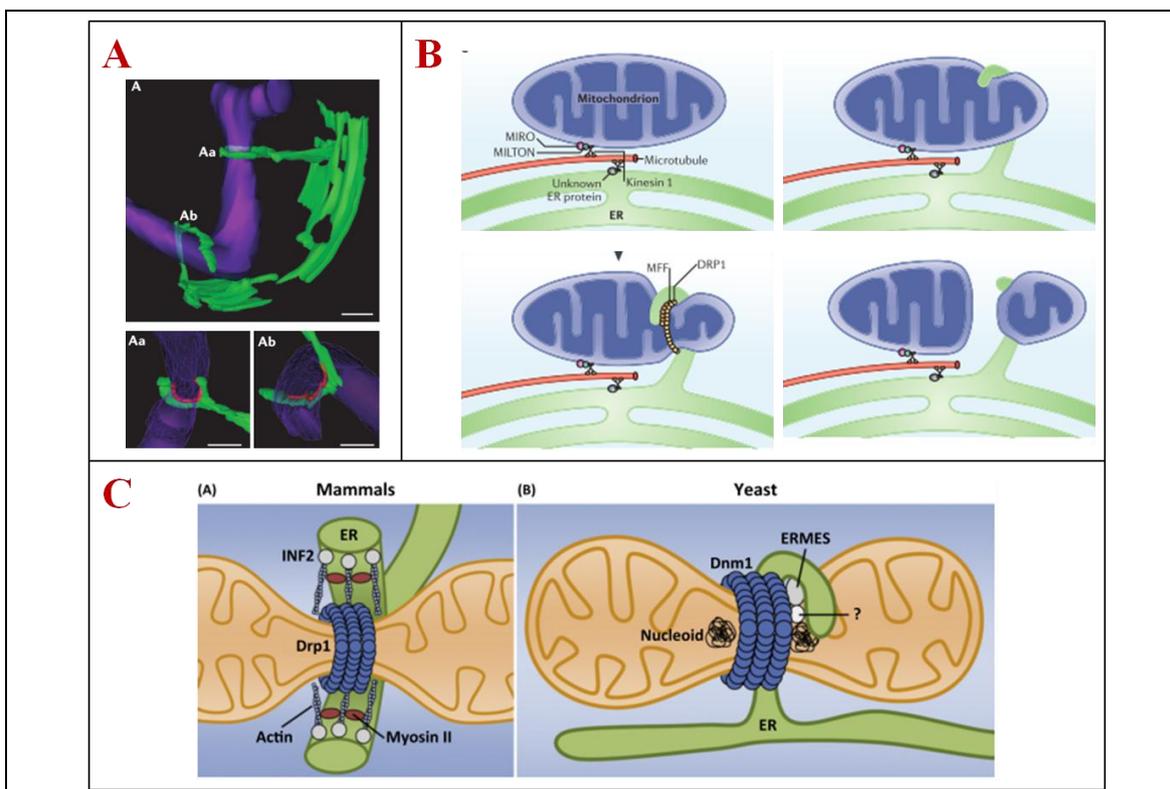
El conocimiento de que el retículo endoplasmático (ER) y las mitocondrias establecen contactos físicos es de hace más de 40 años (Ruby JR, et al. 1969) aunque las zonas MAM donde se establece la comunicación entre ambos orgánulos, no se descubrieron hasta varias décadas después (Vance JE, 1990). Para conocer las funciones de estas zonas hay que viajar más hacia el presente y hoy en día se han detectado más de 75 tipos distintos de proteínas, incluyendo las relacionadas con la homeostasis del calcio, con el metabolismo y transporte de lípidos, con el metabolismo bioenergético y con el estrés del retículo (Hayashi T, et al. 2009). De hecho, se ha calculado que en levaduras hay alrededor de 100 contactos entre el ER y las mitocondrias y que alrededor del 5-20% de la superficie de las mitocondrias de células humanas está en íntima proximidad con el retículo endoplasmático (Rowland AA & Voeltz GK, 2012). Las MAM son zonas muy especializadas donde no se ha detectado la presencia de ribosomas (Csordás G, et al. 2006) y la composición lipídica es distinta ya que es muy rica en cardiolipina (Basova LV, et al. 2007). Además, son muy importantes para el traspaso de iones  $\text{Ca}^{2+}$  entre ambos orgánulos, además de la biosíntesis de lípidos. La principal proteína que se ha descrito que media la conexión física entre ambos orgánulos es Mfn2 (de Brito OM & Scorrano L, 2008). En levaduras se ha descrito el complejo ERMES como el responsable de establecer la conexión entre el ER y las mitocondrias y seguramente tiene otras funciones asociadas como la síntesis de lípidos (Toulmay A & Prinz WA, 2012).

La captación de calcio por parte de la mitocondria estimula la actividad del ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP además de variar las concentraciones de calcio citoplasmáticas, las cuales son críticas para la actividad de numerosas proteínas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Balaban RS, 2009). En neuronas, las mitocondrias suelen desplazarse y localizarse en puntos donde se dan entradas de calcio a la célula a través de la membrana plasmática (Parekh AB, 2003). En células cardíacas y neuronas, la captación de calcio intracelular es muy importante y requiere que las mitocondrias estén equipadas con transportadores de calcio capaces de actuar rápidamente. Los canales que se han descrito en la membrana externa de las mitocondrias son las porinas o VDAC. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  entra en el espacio intermembranal interacciona con varios canales como el MCU, un receptor que solo permite el transporte de calcio en una sola dirección; los canales rápidos (RaM); los transportadores mRyR, los transportadores UCP y el LETM1 (**Figura 19**) (Pan S, et al. 2011). LETM1 es una proteína *antiporter* que entra calcio mientras expulsa protones ( $\text{H}^+$ ) al espacio intermembranal en una forma dependiente de un gradiente de pH (Dimmer KS, et al. 2008). MCU se ha descrito como un canal *uniporter* para el calcio muy importante para el control de la producción energética de las mitocondrias (Kirichok Y, et al. 2004; Baughman JM, et al. 2011).



**Figura 19.** Vías de entrada (captación) de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de las mitocondrias en las zonas de contacto con el retículo endoplasmático (MAM). En la membrana externa actúan las porinas (VDAC) que pasan el calcio al interior donde varios tipos distintos de canales y transportadores se encargarán de pasarlo al interior de la matriz mitocondrial. Esquema tomado de Pan, S et al. 2011.

Otra de las funciones más destacadas asociada al contacto entre ER y mitocondrias es el proceso de fisión tal como se muestra en la **Figura 20 A** (Friedman JR, et al. 2011). En este estudio vieron que la constricción de las mitocondrias por los puntos de fisión había una interacción física con el ER. Drp1, cuando se asocia a las mitocondrias para constreñir, consigue alcanzar un diámetro de alrededor de 100 nm. Este tamaño no es suficiente ya que las mitocondrias tienen, de media, 300 nm de espesor. Estos números respaldan las observaciones de que el primer mecanismo en actuar es el retículo endoplasmático al marcar y empezar a constreñir a la mitocondria (**Figura 20 B**). En estos puntos se concentra Mff y después se recluta Drp1 para terminar de fisionar (Gandre-Babbe S & van der Blik AM, 2008; Westermann B, 2011). Cabe remarcar que algunos estudios también han revelado que la constricción mitocondrial llevada a cabo por el retículo endoplasmático puede ocurrir en la ausencia de Drp1 y Mff, lo que sugiere que la selección de los puntos de fisión por parte del RE se produce antes del montaje de la maquinaria de fisión encabezada por la propia Drp1 (Rowland AA & Voeltz GK, 2012). En este proceso también está implicado el citoesqueleto en el proceso. En mamíferos se ha descrito la participación del citoesqueleto de actina en la constricción de las mitocondrias. Concretamente se ha visto que la proteína INF2 que se encarga de acelerar la polimerización y despolimerización de los filamentos de actina, ayuda en promover la fisión (**Figura 2.0 C**). Dentro del sistema, INF2 promueve la polimerización de la actina y la Miosina II generaría la fuerza necesaria para ayudar a constreñir la mitocondria antes de la llegada de Drp1 (Korobova F, et al. 2013). Además, se ha demostrado que la actina es necesaria para la activación de Drp1 y la subsiguiente fragmentación mitocondrial aunque el proceso no está del todo bien descrito (De Vos KJ, et al. 2005).



---

**Figura 20.** El retículo endoplasmático es el responsable de marcar los puntos donde la mitocondria se fisionará. **A)** Representación tridimensional de cómo el ER abraza la mitocondria y marca los puntos de futuras fisiones. **B)** Esta unión es anterior al reclutamiento de Drp1 por su receptor Mff. **C)** La participación de los filamentos de actina en este sistema es evidente. Se requiere la acción de INF2 y la Miosina II para conseguir hacer fuerza y constreñir la mitocondria antes de la llegada de Drp1. En levaduras se ha descrito el complejo proteico ERMES como responsable de la unión física entre ambos orgánulos. Esquema (A) tomado de Friedman JR, et al. 2011; esquema (B) modificado de Rowland AA & Voeltz GK, 2012; esquema (C) tomado de Klecker T, et al. 2014.

Experimentos de *live cell imaging* con el microscopio confocal revelaron que ambos orgánulos se desplazaban juntos a lo largo de los microtúbulos utilizando las proteínas motoras conocidas y que estos microtúbulos donde contactan deben estar acetilados (Friedman JR, et al. 2010). Las enzimas histona deacetilasas (HDAC) son conocidas principalmente por su papel en la deacetilación de las histonas y, por tanto, en la represión de la expresión de genes. Muchas drogas utilizadas contra las HDAC en cáncer (Minucci S & Pelicci PG, 2006), se han probado también en varias enfermedades neurodegenerativas demostrando ser buenas y proteger las neuronas del daño isquémico (Gibson CL & Murphy SP, 2010). A pesar de los resultados *in vitro*, ninguna de ellas ha llegado al mercado. Por otro lado se demostró que la aplicación de inhibidores antes o después de un período de hipoxia cerebral, se conseguía restaurar el buen funcionamiento aumentando los transportadores de glutamato de los astrocitos, disminuyendo la acumulación del glutamato en las sinapsis, preservando el buen funcionamiento de las mitocondrias y manteniendo los niveles óptimos de ATP (Baltan S, et al. 2011). Uno de los más utilizados es SAHA y se ha visto que aumenta el porcentaje de mitocondrias tubulares en muchos tipos celulares utilizados (Lee JS, et al. 2011). También se ha estudiado que al inhibir las HDAC se previene la fragmentación mitocondrial y se genera neuro-protección en células modelo de la enfermedad del Parkinson mediante el MPP<sup>+</sup> (Zhu M, et al. 2013).

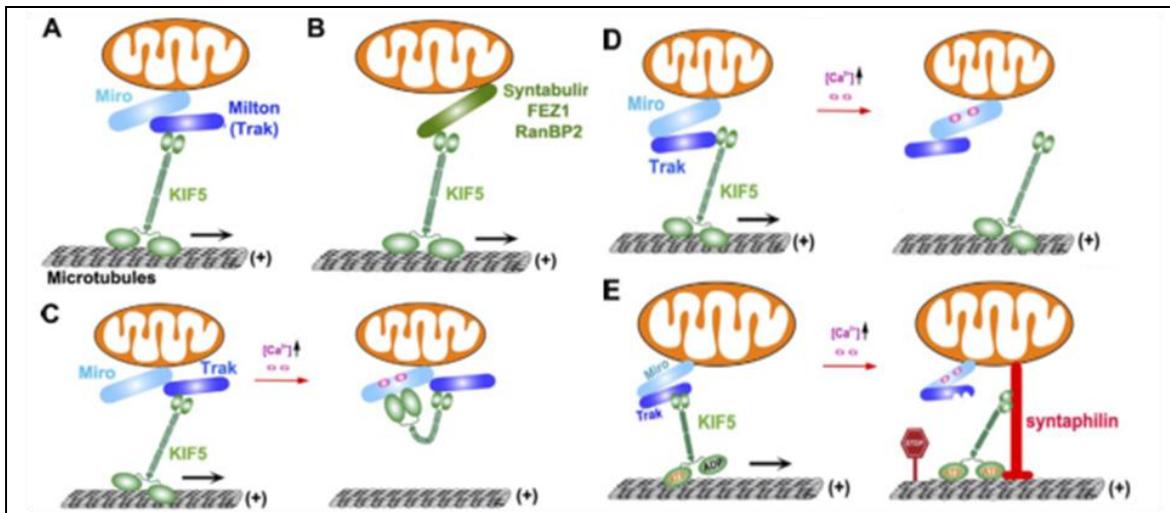
#### *Desplazamiento de mitocondrias*

En neuronas, las mitocondrias deben desplazarse largas distancias para cubrir las demandas de energía y de almacenamiento de calcio que la célula requiere. Por estos motivos, una neurona madura presenta sus mitocondrias tubulares perfectamente repartidas por toda su extensión y el 65-80 % de ellas son estacionarias, se mueven muy poco (Kang JS, et al. 2008). Las zonas donde más se requiere la aportación de energía de las mitocondrias suelen ser la terminal axónica, los nódulos de Ranvier y los conos dendríticos. Debido al tamaño y estructura de las neuronas, el mecanismo de transporte mitocondrial es especial y suele ir desde el soma hacia su destino. En el citoesqueleto de actina se realizan movimientos de corta distancia con la ayuda de las proteínas motoras Miosinas. Los desplazamientos largos requieren un citoesqueleto más firme como son los microtúbulos de tubulina que requieren de otras proteínas motoras: las dineínas para el transporte retrógrado y las quinesinas para el transporte anterógrado (Hollenbeck PJ, 1996).

Milton es una proteína adaptadora vinculada al movimiento de las mitocondrias. Es una proteína que hace de puente entre las proteínas motoras y las mitocondrias. Concretamente interaccionan con la GTPasa Miro de la membrana externa de las mitocondrias (**Figura 21**) (Stowers RS, et al. 2002). Miro contiene dos dominios GTPasa separados y también dos dominios de unión al Ca<sup>2+</sup>. Además, Mfn2 se ha descrito que es necesaria para el transporte mitocondrial ya que interactúa con el complejo Miro/Milton facilitando su función. Se analizó la motilidad

mitocondrial en cultivos de neuronas que contenían mutaciones típicas de la enfermedad Charcot-Marie-Tooth (CMT) y se vio que el transporte estaba muy reducido (Misko A, et al. 2010). Se ha descrito que PINK1 y Parkin son las responsables de ubiquitinar tanto a Mfn2 como a Miro para su degradación vía proteasoma (Wang X, et al. 2011). Milton puede unirse a las proteínas motoras mediante su extremo C-terminal y su función no solamente es el transporte de mitocondrias ya que también ayudan en el movimiento de endosomas. La interacción Miro-Milton es necesaria ya que silenciar la expresión de Milton o la utilización de formas dominante negativa contra Milton en neuronas del hipocampo imposibilita la movilidad de las mitocondrias (MacAskill AF, et al. 2009). Cuando las entradas masivas de calcio no pueden ser paradas, como es en el caso de la abertura de los receptores NMDA sin control durante la isquemia promoviendo la excitotoxicidad, las mitocondrias se paran en estas zonas y proceden a captar el calcio. Esto promueve que enzimas dependientes de  $Ca^{2+}$  puedan activarse, como la CaMKI $\alpha$  promoviendo la fosforilación de Drp1 en la Serina 600 conduciendo a la fragmentación de las mitocondrias (Han XJ, et al. 2008). Hay otras proteínas adaptadoras de las mitocondrias descritas como la Sintabulina, FEZ1 y RanBP2 (Sheng Z-H & Cai Q, 2012).

Las mitocondrias son dirigidas por el citoesqueleto hacia las zonas donde aumenten las concentraciones de calcio. De hecho, un aumento repentino de calcio provoca que la mitocondria se pare ya sea porque separa al complejo Miro-Milton de la proteína motora o porque consigue separarse del microtúbulo arrastrando también la dineína (**Figura 21**). Otro modelo que se ha propuesto es la participación de la proteína Sintafilina que consigue capturar las proteínas motoras e interactuar con las mitocondrias frenándolas en un punto fijo pero sin dejar que se separen del microtúbulo (Sheng Z-H, 2014).



**Figura 21.** Modelos propuestos de transporte mitocondrial. La maquinaria está formada por las proteínas Miro-Milton-Quinesina/Dineína aunque existen otras adaptadoras además de Milton, como son la Sintabulina, FEZ1 y RanBP2. Cuando las concentraciones de calcio aumentan en la célula las mitocondrias se paran por varios procesos sugeridos. Un modelo podría ser que toda la maquinaria se separe del microtúbulo. El otro sería que Milton se separase de la proteína motora, drenando la mitocondria. Por otro lado, se ha descrito la proteína Sintafilina que actúa frenando y anclando la mitocondria en un punto fijo del microtúbulo. Esquema tomado de (Sheng Z-H, 2014).

Se ha comentado que los desplazamientos cortos de mitocondrias pueden darse en los filamentos de actina con la ayuda de la proteína motora Miosina. A pesar de ello, la interacción

---

directa entre las mitocondrias y las Miosinas no se ha demostrado en neuronas, aunque hay evidencias de que esta unión podría darse porque los cambios en la expresión de la Miosina XIX muestra problemas de motilidad mitocondrial (Quintero OA, et al. 2009). Algunos autores defienden que en ciertas zonas de las neuronas, como las terminales nerviosas y los conos dendríticos, las proteínas motoras del citoesqueleto podrían estar compitiendo para capturar las mitocondrias (Sheng Z-H & Cai Q, 2012).

Hace pocos años se describió una nueva proteína en neuronas llamada Alex3 que interacciona con el complejo Quinesina-Miro-Trak (López-Doménech G, et al. 2011). La proteína Alex3 está codificada en el cromosoma X y es un gen único de algunos mamíferos. Se encuentra muy expresado durante el desarrollo y el sistema nervioso del adulto. Vieron que su interacción con este complejo era dependiente de  $Ca^{2+}$  y, en principio, no participaba en la modificación de la dinámica mitocondrial. A pesar de ello, más adelante describieron que Wnt participa en la posible regulación de la agregación de las mitocondrias vía Alex3 (Serrat R, et al. 2013).

#### *Peroxisomas/Lisosomas y formación de MDVs*

Hace poco tiempo se describió tanto la interacción física como la comunicación directa por parte de las mitocondrias hacia los peroxisomas/lisosomas mediante contacto directo y unas estructuras vesiculares llamadas MDVs (**BOX 3**).

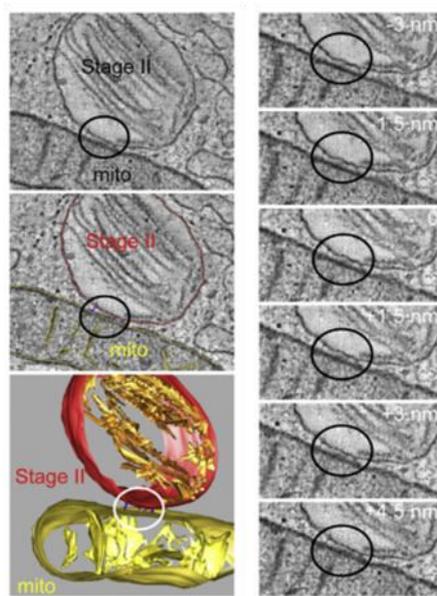
#### **BOX 3** Interacción entre mitocondrias y peroxisomas/lisosomas mediante las MDVs

Los peroxisomas fueron descritos por primera vez en la década de los 60 cuando fueron aislados a partir del hígado de rata y se comprobó que eran unos orgánulos muy ricos en enzimas oxidativas y catalasas (De Duve C & Baudhuin P, 1966). En comparación con las mitocondrias (0,5 – 0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro), los peroxisomas tienen un tamaño más variable (0,1 – 1  $\mu\text{m}$  de diámetro) y morfológicamente se caracterizan por tener una única membrana y una matriz granular desprovista de ADN. La importancia en su investigación apareció cuando se les vincularon ciertas enfermedades humanas (Síndrome de Zellweger) a su mal funcionamiento en, por ejemplo, la  $\beta$ -oxidación de cadenas largas de ácidos grasos y en la biosíntesis de glicerolípidos (Heymans HS, et al. 1983). Hasta la fecha se han descrito más de 50 enzimas que forman parte de los peroxisomas de mamíferos. En contraste con las mitocondrias y el ER, los peroxisomas pueden importar las proteínas completamente plegadas a través de un mecanismo que todavía no se conoce (Erdmann R, et al. 2005). Además, se sugiere que los peroxisomas pueden crearse de nuevo a partir de un sub-dominio del ER (Hoepfner D, et al. 2005). Igual que las mitocondrias, los peroxisomas parecen jugar un importante papel en multitud de procesos fisiológicos y patológicos relacionados con la generación de ROS.

Se ha descrito que las mitocondrias y los peroxisomas son orgánulos muy dinámicos que constantemente están cambiando de tamaño y grosor y se desplazan, gracias a proteínas motoras, a través del citoesqueleto. Gracias al microscopio electrónico y a las técnicas de microscopía confocal, se ha observado una gran variedad de tipos morfológicos de peroxisomas en líneas celulares y tejidos de mamíferos. Pueden tener forma esférica, estar en forma tubular o tubulo-reticular, etc (Hicks L & Fahimi HD, 1977). Estos cambios de forma y tamaño han de ser llevados a cabo por algún sistema igual o similar al de las mitocondrias si tenemos en cuenta que la evolución siempre ha intentado ahorrar energía. Efectivamente, en 2003 se demostró la presencia de Drp1 en el proceso de fisión de los peroxisomas (Koch A, et al. 2003). Estas

observaciones se verificaron tanto por microscopia como co-inmunoprecipitación. Igual que con las mitocondrias, utilizar una forma dominante negativa de Drp1 y silenciar su expresión con siRNAs, se generan peroxisomas tubulares. La acción de Drp1 sobre los peroxisomas parece estar más enfocada a cortar que no a constreñir y su reclutamiento depende de Fis1 (Koch A, et al. 2005).

Los melanosomas son lisosomas especializados de células pigmentadas (melanocitos y el epitelio pigmentario de la retina). Su función es la síntesis, almacenamiento y transporte de melanina. Se originan en endosomas tempranos y van sufriendo una serie de maduraciones que consisten en ir depositando melanina en el interior y transportar el orgánulo hasta la periferia de la célula (Reposo G, et al. 2001). Hay evidencias que apuntan a que ciertas proteínas de las mitocondrias son esenciales para regular los componentes pigmentarios de los melanosomas y que problemas en las mitocondrias se relacionan con enfermedades pigmentarias tipo el albinismo (**Figura III**) (Hirobe T, et al. 2008). Para descifrar e investigar una posible comunicación cruzada entre mitocondrias y melanosomas, una colaboración entre varios laboratorios de Milán, París y Génova, encontraron por primera vez que ambos orgánulos establecen comunicación física directa modulada por Mfn2 creando zonas especializadas semejantes a las MAM que se establecen entre ER y mitocondrias (Daniele T, et al. 2014). A parte de la especialización de acumular melanina por parte de los melanosomas, también son repositorios de calcio, de modo que es posible que estas uniones estrechas tan parecidas a las del ER, sean también para regular la señalización y almacenamiento de calcio por parte de las mitocondrias (Bush WD & Simon J, 2007).

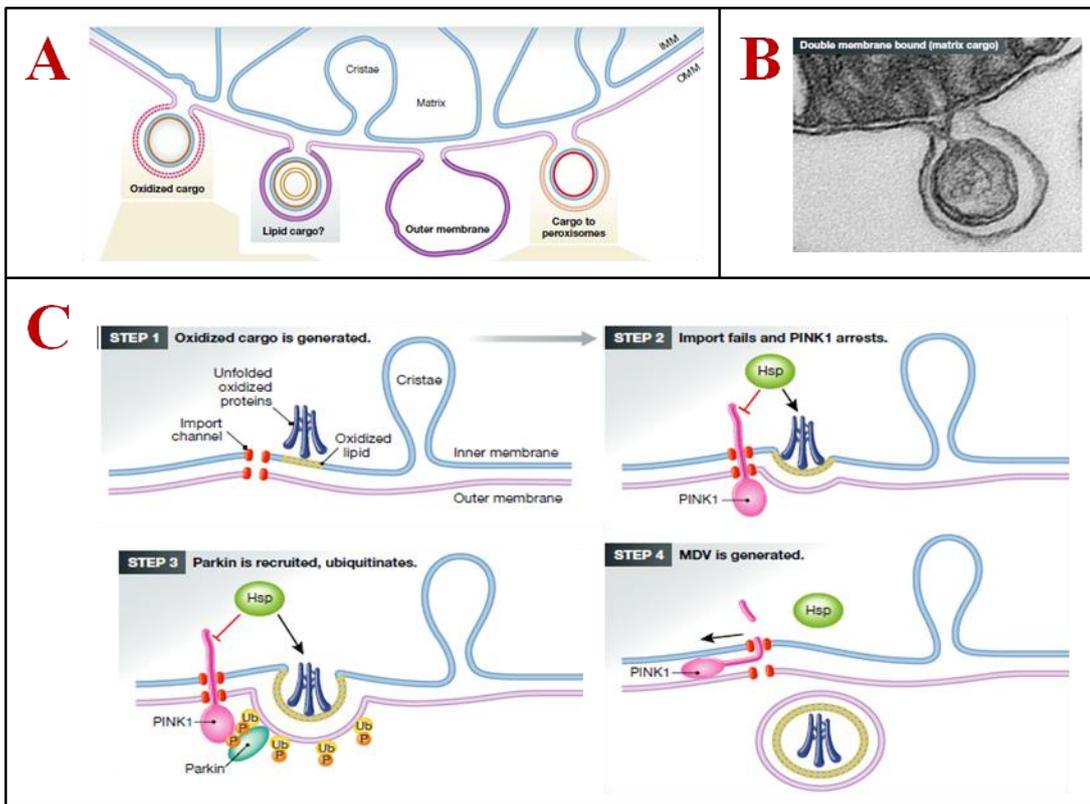


**Figura III.** Contactos entre mitocondrias y melanosomas. Con microscopía electrónica observaron puentes que unían físicamente ambos orgánulos, una mitocondria y un endosoma en estado II de especialización. Comprobaron que estos puentes están establecidos por Mfn2. Imágenes tomadas de Daniele T, et al. 2014.

Muchas de las funciones metabólicas que se desencadenan total o parcialmente en las mitocondrias, incluyen sustratos y productos que fluyen entre los orgánulos. Esto demuestra que alguna forma de comunicación debe existir. Siempre se ha explicado que las mitocondrias,

cloroplastos y peroxisomas no formaban parte del sistema vesicular de la célula que conectaba el ER, el Golgi, los endosomas/lisosomas y la membrana plasmática. Como tantas otras veces ha ocurrido en biología celular, las teorías pueden ser muy fácilmente revertidas ya que se ha descubierto un sistema de transporte vesicular que nace en las mitocondrias y tiene como diana otro orgánulo, son las *mitochondrial-derived vesicles* (MDVs, por sus siglas en inglés) (**Figura IV A, B**). Es un sistema que se compone de proteínas concentradas en la membrana externa de las mitocondrias que deben ser eliminadas o enviadas a endosomas tardíos, peroxisomas y lisosomas (Neuspiel M, et al. 2008). Aunque parezca un sistema de fisión, la generación de estas vesículas no requiere la participación de Drp1 o Fis1. Las proteínas involucradas que se han descrito son PINK1 y la E3 ligasa Parkin (**Figura IV C**) (McLelland G-L, et al. 2014). Su activación debe venir vinculada a otro tipo de estímulos diferentes a los que promueven la mitofagia. Quizás, en la formación de MDVs es muy importante la generación y acumulación de ROS en la mitocondria ya que muchas proteínas a transportar a los peroxisomas están oxidadas. Además, a diferencia de otros mecanismos, la activación de PINK1 en este contexto no está vinculada al potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). El estudio de ambas enzimas y la formación de las MDVs en la enfermedad del Parkinson podría ser muy interesante ya que se han descrito mutaciones en PINK1 y Parkin que imposibilitan la eliminación de las mitocondrias vía la mitofagia y, seguramente, también la eliminación de proteínas oxidadas de las mitocondrias vía MDVs (Muftuoglu M, et al. 2004).

En la evolución, el sistema de envío de vesículas proviene de los microorganismos. Muchos tipos de bacterias emiten vesículas cargadas con toxinas de índole diversa una vez han colonizado la célula huésped. Estas vesículas se utilizan para frenar el ciclo celular del huésped y poder así capturar la maquinaria (Sugiura A, et al. 2014). Por lo tanto, el origen de las MDVs dirigidas a peroxisomas y lisosomas podría provenir claramente de su ancestro procariota.



---

**Figura IV.** Generación de MDVs. **A, B)** Por inmunofluorescencia y microscopía electrónica se han identificado diferentes tipos de MDVs con distinto contenido y envoltura. Se cree que puede ser debido a que su diana es distinta también. **C)** La formación de vesículas más estudiada en las mitocondrias es la mediada por PINK1 y Parkin. En ningún momento se requiere la acción de Drp1. Ambas enzimas se encargan de señalar y formar la MDV ante ciertos estímulos como podría ser el aumento del ROS. Esquemas (A – C) tomados de Sugiura A, et al. 2014.

### **La dinámica mitocondrial y las enfermedades neurodegenerativas**

Todas las enfermedades neurodegenerativas son muy complejas y tienen una diversidad fenotípica dispar. Gracias a los avances tanto a nivel fisiopatológico como a nivel genético, se han comenzado a revelar muchos datos de interés. Estos datos vinculan a muchos orgánulos y complejos proteicos de la célula como el retículo endoplasmático (ER), el proteasoma, la autofagia, agregación de proteínas mal plegadas, etc. Problemas a estos niveles se incrementan hasta niveles superiores promoviendo estrés oxidativo, tráfico subcelular alterado y neuroinflamación del tejido. Pero el tema que más expectación está despertando hoy en día y más científicos está sumando a un debate internacional es el papel de la función de las mitocondrias, no solamente en lo que respecta a los defectos en la producción de energía, sino también a la dinámica mitocondrial (la forma de los orgánulos, tamaño, distribución, movimiento y anclaje), la comunicación con otros orgánulos (el ER, los peroxisomas/endosomas, la membrana plasmática, el citoesqueleto y el núcleo) y su vinculación con las enfermedades neurodegenerativas crónicas y agudas. Como se ha comentado con anterioridad, la excitotoxicidad es un fenómeno que cursa en muchas estas enfermedades y es la excitotoxicidad la que afecta la dinámica mitocondrial y acaba generando la muerte de las neuronas.

El estudio genético de las enfermedades ha desvelado que hay unos 188 locus distintos y 106 genes que se han relacionado directamente con las enfermedades neurodegenerativas más comunes. De estos 106 genes, 36 (un 34 %) tienen una relación directa (proteínas que forman parte de la estructura y bioquímica de las mitocondrias; 24 genes) o indirecta (proteínas que no forman parte de estos orgánulos pero actúan sobre ellos de forma secundaria como los encargados de establecer las comunicaciones ER-mitocondrias; 12 genes) (Schon EA & Przedborski S, 2011).

Cabe destacar que numerosos estudios apuntan a que la alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  es un punto crucial en la progresión de estas enfermedades porque se localiza, sobretodo, a nivel mitocondrial generando defectos en su morfología y funcionalidad (Cali T, et al. 2012).

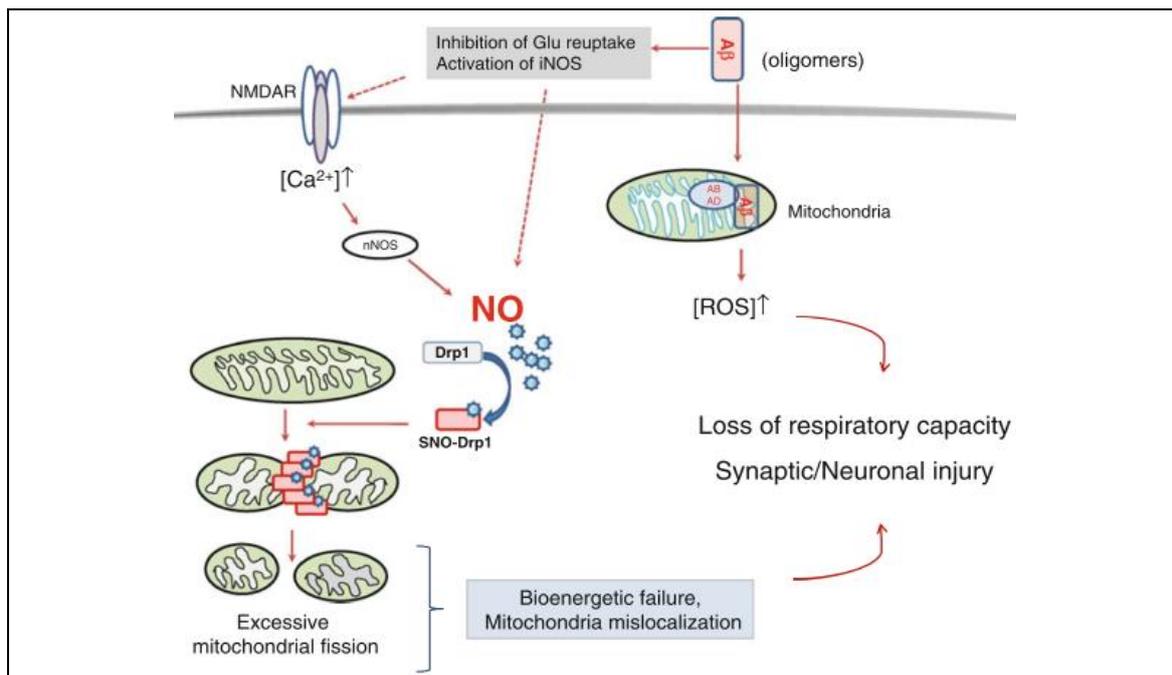
#### *Principales enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer, Parkinson y Huntington*

La enfermedad de Alzheimer es la primera causa de demencia en personas de todo el mundo. Comienza con una suave y lenta progresión de pérdida de la memoria y luego con un continuo de síntomas debilitantes, como la pérdida completa de las capacidades cognitivas y las funciones corporales, en última instancia conduce a la muerte. Aunque los casos de Alzheimer son en su mayoría esporádicos, en general, los primeros síntomas no aparecen hasta después de los 60 años. La acumulación del péptido  $\beta$  amiloide ( $\text{A}\beta$ ) y la proteína tau hiper-fosforilada conduce a la disrupción de las sinapsis neuronales mediante la interrupción de su conectividad y

plasticidad. Además, también se da lugar a errores a nivel de la homeostasis del calcio por el aumento de los ROS y el NO (Wyss-Coray T, 2006; Brunden KR, et al. 2009).

El A $\beta$  es un inductor directo de problemas a nivel mitocondrial ya que puede ser incorporado al orgánulo mediante la maquinaria clásica de transportadores TOM y TIM (ver **BOX 3**) (Hansson Petersen CA, et al. 2008). Su ubicación en las crestas promueve la inhibición de ciertos componentes importantes como el metabolismo respiratorio. Además, la enzima ABAD, una alcohol dehidrogenasa, se ha descrito que interacciona directamente con el A $\beta$  incrementando la toxicidad mitocondrial al generar ROS (Lustbader JW, et al. 2004). El NO es una molécula de señalización involucrada en muchos procesos fisiológicos de la célula incluyendo la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica. Sin embargo, cuando los niveles de NO son excesivos, pueden contribuir a la toxicidad neuronal (**Figura 22**). Se ha demostrado experimentalmente que la exposición de neuronas al A $\beta$  oligomerizado, aumenta la nitrosilación en el residuo Cisteína 644 (ver **Figura 12**) de Drp1 causando fragmentación mitocondrial (Cho D-H, et al. 2010).

Otra actuación del A $\beta$  en la progresión de la muerte neuronal es su capacidad de oligomerizarse en la membrana plasmática generando un canal que permite la entrada de iones Ca $^{2+}$  al interior de la célula creando excitotoxicidad (Demuro A, et al. 2005). También se ha observado que el A $\beta$  puede inducir la salida masiva de calcio del RE en las zonas MAM y provocar que las mitocondrias sufran un colapso a la hora de tamponarlo ya que la síntesis de ATP se ve afectada, aumenta la producción de ROS, se forma el PTP y se libera el citocromo c al citosol y se inicia la apoptosis (Calì T, et al. 2012). Las presenilinas (PS), unas enzimas encargadas de procesar el APP, la molécula precursora del A $\beta$ . Se han localizado en el Golgi, el RE y las mitocondrias. Mutaciones en estas enzimas se han asociado directamente con el Alzheimer ya que son las responsables de cortar erróneamente el APP generando el A $\beta$  además de tener un papel clave en la homeóstasis del calcio. El *link* entre las PS y el Ca $^{2+}$  es su vinculación con los canales de calcio del RE como el SERCA ya que mutaciones en PS son lo que provocan estas salidas de calcio a las zonas MAM (Brunello L, et al. 2009).



---

**Figura 22.** El  $\beta$  amiloide induce la fisión mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer. La acumulación del  $A\beta$  fuera de la célula puede promover isquemia y excitotoxicidad, es decir, aumentar la activación del receptor NMDA e inducir la entrada de calcio al interior de la célula. Esto conlleva la activación de la enzima nNOS que aumenta los valores intracelulares de NO llevando a la nitrosilación de Drp1. Esto promueve la fragmentación de las mitocondrias. Por otro lado, el  $A\beta$  es transportado al interior de las mitocondrias donde interacciona con ABAD incrementando los ROS. Todo en su conjunto provoca una pérdida en la capacidad respiratoria y diferentes daños neuronales que conllevan la muerte. Esquema tomado de ChoD-H, et al. 2010.

En resumen, en la enfermedad de Alzheimer se ha estudiado en pacientes que los niveles de expresión de algunas proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial, como Drp1, Opa1 y las Mfn1 y 2, se encuentran reducidos en neuronas humanas del hipocampo (Wang X, et al. 2009; Manczak M, et al. 2011), mientras que Fis1 incrementa sus niveles de expresión, seguramente vinculado al papel que juega en los procesos de mitofagocitosis que en todas estas enfermedades se ven incrementados (Yamano K, et al. 2014).

El Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común por detrás del Alzheimer. Se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas en una zona del cerebro llamadas sustancia nigra y también por la acumulación de inclusiones intracelulares llamadas cuerpos de Lewy. Estos cuerpos son acumulaciones de una proteína, la  $\alpha$ -sinucleína. La mayoría de los casos de Parkinson son esporádicos y probablemente causados por toxinas ambientales, pero alrededor del 5-10% de los casos son de origen genético. Las primeras evidencias propuestas que relacionan la disfunción mitocondrial con esta patología fueron en 1983 al observarse que las neuronas afectadas acumulaban mucho estrés oxidativo (Cho D-H, et al. 2010).

A nivel molecular encontramos que la cadena respiratoria mitocondrial se encuentra afectada en Parkinson y hay una serie de mutaciones genéticas en los genes de PINK1, Parkin y LRRK2 que conllevan alteraciones en las mitocondrias y el proceso de mitofagocitosis (Abou-Sleiman PM, et al. 2006). Se ha descrito que  $\alpha$ -sinucleína puede modular la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula de una forma parecida al  $A\beta$ : creando poros en la membrana plasmática por oligomerización o activando canales de calcio de la membrana (Cali T, et al. 2012). Se sospecha que la  $\alpha$ -sinucleína tiene su ubicación y función principal en las zonas MAM, posiblemente participa en la regulación del calcio. Su pérdida de función vinculada al Parkinson, su acumulación, el aumento de ROS y NO, la formación de PTP y la liberación del citocromo c al citosol son los problemas asociados y que vienen vinculados a la desregulación del calcio (Parihar MS, et al. 2009).

El Huntington es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de las neuronas del tipo GABAérgicas de la zona del cerebro llamado estriado. Los síntomas principales son la motilidad deteriorada que provoca la conocida corea, demencia y otros defectos neuropsiquiátricos. La causa genética es la expansión anormal de repeticiones llamadas CAG en el gen que codifica la proteína huntingtina (Htt). Las formas mutantes de Htt contienen más de 35 repeticiones de CAG y hay una correlación directa entre el número de repeticiones y la gravedad de la enfermedad (Bates G, 2003). Htt es una proteína localizada principalmente en el citosol de la célula, pero también se encuentra en los compartimentos del RE, las mitocondrias, en el núcleo y en el aparato de Golgi. Sus funciones exactas todavía se desconocen, aunque se ha detectado su participación en la regulación de la transcripción, en

---

varias funciones mitocondriales, la producción de ROS, el tráfico de orgánulos y la apoptosis (Cho D-H, et al. 2010). Con la proteína Htt se ha visto que en cultivos primarios de neuronas corticales de rata se bloquea casi totalmente el movimiento de las mitocondrias y que ratas transgénicas para la Htt mutada presentan problemas a nivel de tráfico tanto de vesículas como de mitocondrias (Trushina E, et al. 2004). Además, también se ha encontrado que la activación del NMDAR extrasináptico está aumentado en neuronas modelo de Huntington (Milnerwood AJ, et al. 2012).

Recientemente también se ha detectado Htt en las zonas MAM y de una forma parecida al Alzheimer, la Htt también promueve la nitrosilación y consiguiente activación de Drp1 promoviendo la fragmentación mitocondrial. Además, la sobreexpresión de la forma dominante negativa de Drp1 o de una forma nativa de Mfn2, reducen la fragmentación generada por Htt (Wang H, et al. 2009). El *link* entre el Huntington y la regulación del calcio no está tan ampliamente estudiado como en las otras dos enfermedades aunque se sabe que este ión se acumula y acaba generando la fragmentación de las mitocondrias y la activación de la apoptosis.

---

## APOPTOSIS

### Proteínas involucradas en el proceso de apoptosis

El gen codificante de la proteína Bcl-2 fue inicialmente identificado en células B malignas, donde la traslocación cromosomal activa la Bcl-2 en un 85%. Las señales inductoras de su activación son la privación de factores de crecimiento, rayos ultravioleta, radiación gamma, choques térmicos, algunas citoquinas citotóxicas, ionóforos de calcio, infecciones virales y agentes formadores de radicales libres (Schendel SL, et al. 1998).

Las proteínas pertenecientes a la familia de las Bcl-2 están formadas por varios dominios homólogos (de BH1 a BH4). La estructura proteica tridimensional de las hélices alfa de las regiones BH1 y BH2 han revelado una hendidura hidrofóbica donde se pueden unir las hélices alfa anfipáticas de BH3 (Lanave C, et al. 2004). El motivo BH4 se ha caracterizado como el estabilizador de la estructura hidrofóbica de la ranura. Los miembros de la familia de las Bcl-2 se han identificado en todos los organismos metazoos estudiados. Además se han descrito en invertebrados como los nemátodos, insectos y, recientemente, en esponjas. En innumerables estudios se ha observado que las proteínas anti-apoptóticas contienen los dominios BH1 y BH2. Por otro lado, las proteínas pro-apoptóticas mantienen en común el dominio BH3 (Brunet AA, et al. 2005).

La apoptosis está estrechamente relacionada con los cambios en la morfología mitocondrial. En la mayoría de vías de apoptosis conocidos actúan como integradoras de señales de muerte. Poco después de la inducción de la apoptosis, Bax, una proteína pro-apoptótica Bcl-2, se transloca a la mitocondria (Wolter KG, et al. 1997). Aquí se une formando grupos en sitios específicos donde, posteriormente, ocurrirán eventos de fisión mitocondrial. Bax, sin embargo, no es la única proteína que muestra este fenómeno: su estrecha homóloga es la proteína Bak, que en las células sanas se distribuye de forma homogénea a lo largo de la membrana mitocondrial externa, también forma agrupaciones que localizan con Bax (Nechushtan A, et al. 2001). Curiosamente, los puntos de la membrana donde Bax y Bak interaccionan contienen una constitución lipídica característica, como es la presencia de cardiolipina (Kuwana T, et al. 2002), lípido de origen bacteriano y ausente en todo el resto de la célula eucariota.

AIF es una proteína mitocondrial que es vertida al citoplasma durante la apoptosis y su función es estimular una vía de muerte programada independiente de las caspasas, que es esencial para la morfogénesis de los mamíferos (Joza N, et al. 2001). Esta proteína se ha encontrado, con una estructura y función extremadamente parecidas, en Bacteria, Arquea y Eucariota. Lo mismo ocurre con el caso de las caspasas, las principales proteínas encargadas de, una vez activadas, conducir a la célula a su muerte. Se han encontrado homólogos en *Dictyostelium*, hongos y plantas (Uren AG, et al. 2000).

### Mecanismo de apoptosis

Cuando las primeras células eucariotas empezaron a organizarse en organismos multicelulares, pareció ventajoso inventar un programa de muerte celular para encontrar un balance entre estructuras y controlar la complejidad de los tejidos. Esto significó que el destino celular

---

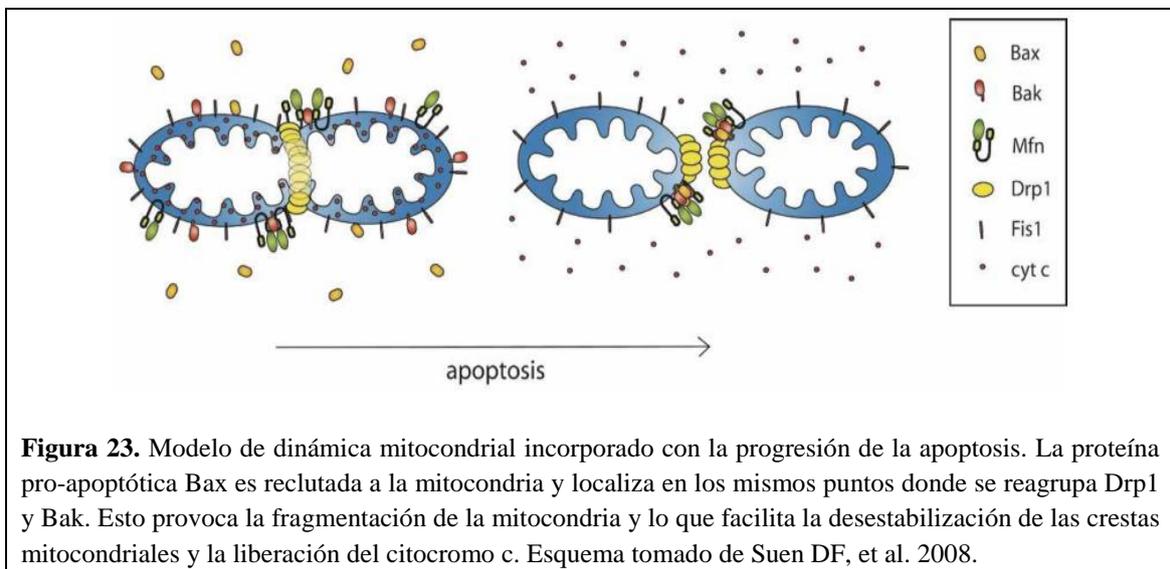
individual tuvo que sacrificarse para el beneficio del organismo. Este punto de vista se podría extrapolar a los principios de evolución de Charles Darwin, donde la naturaleza no “inventa” nuevos genes con funciones específicas, si no que cambia y adapta los pre-existentes mediante mutaciones en el DNA. Esta plasticidad genética permitió el desarrollo de nuevas formas y funciones de grado y complejidad superior.

La apoptosis interviene en el catabolismo de las células eucariotas de una forma crucial para el desarrollo de los metazoos para controlar el tamaño de los tejidos, mantener las vías de defensa y para la protección contra cáncer. Todas las vías de apoptosis convergen en la activación de las caspasas, unas proteasas que orquestan la demolición eficiente y no inflamatoria de las células. La etapa de control mitocondrial de la apoptosis es anterior a la activación de las caspasas y esta regulación está mediada por las proteínas de la familia de las Bcl-2 (Huettenbrenner S, et al. 2003). Las procaspasas son los precursores inactivos de las caspasas, los cuales son activados por escisión proteolítica. No todas las caspasas median la apoptosis ya que algunas participan en las respuestas inflamatorias e inmunitarias (Kumar S, 2007). A grandes rasgos, las caspasas pueden clasificarse en iniciadoras o activadoras. Las iniciadoras son las que actúan al inicio de la cascada proteolítica y son las encargadas de escindir y activar a las ejecutoras que son las que empiezan a proteolizar otras proteínas diana específicas de la célula. Estas dianas pueden ser las laminas nucleares, endonucleasas, componentes del citoesqueleto, proteínas de adhesión, etc (Boatright KM & Salvesen GS, 2003). Las dos vías de señalización mejor comprendidas que participan en la activación de la cascada de caspasas desencadenando la apoptosis, son las siguientes:

- La vía extrínseca iniciada en receptores de la superficie celular que conducen directamente a la activación de la caspasa 8. En este caso, el punto de inicio de la apoptosis es la familia de receptores de membrana TNF, un tipo de receptor con un único dominio transmembrana y un dominio de muerte intracelular. La activación proviene del exterior celular, es decir, a partir de la unión, por ejemplo, de un ligando Fas de la superficie de un linfocito citotóxico con el receptor Fas de la célula diana. Esta unión activa varias recluta proteínas adaptadoras intracelulares encargadas de reclutar procaspasas iniciadoras formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). A partir de este punto, es cuando se inicia la cascada de caspasas (Lavrik I, et al. 2005).
- La vía intrínseca que está regulada por las mitocondrias. En esta vía participan señales provenientes del propio interior celular tales como acumulación de ROS, daño al ADN y falta de nutrientes u oxígeno. En este caso, la cascada de caspasas es activada por dichas señales internas que acaban provocando la liberación del citocromo c desde las crestas mitocondriales al citoplasma gracias a los poros formados por Bax y Bak (Danial NN & Korsmeyer SJ, 2004). La liberación del citocromo c es lo que oficialmente se considera el principal activador de la cascada de las caspasas. De hecho, se ha calculado que la salida del citocromo c se da unos 15 minutos después de que Bax haya sido reclutada a la mitocondria y haya formado el PTP (Karbowski M, et al. 2004). Cuando el citocromo c sale al citosol, interacciona con Apaf1 creando el llamado apoptosoma que será el responsable de activar la caspasa 9 (Bao Q & Shi Y, 2007). Esto iniciará una cascada donde se empezarán a destruir proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

El papel de la mitocondria en la apoptosis se ha relacionado con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, que se considera un punto de no retorno en el proceso apoptótico (Zamzami N, et al. 1995). En el proceso apoptótico se libera el citocromo c y otras proteínas

mitocondriales como Smac/Diablo que activan las caspasas y se ha visto que durante estadios tempranos de la apoptosis se fragmentan las mitocondrias (Wang X, 2001). La proteínas pro-apoptótica de la familia de las Bcl-2, Bax, es esencial en la vía mitocondrial de la apoptosis (Wei MC, et al. 2001). Bax es citosólica en células sanas, pero la iniciación del proceso apoptótico provoca su localización en puntos de la mitocondria junto con el también miembro de la misma familia, Bak (Hsu YT, et al. 1997). Se ha propuesto que el mecanismo por el que Bax induce la apoptosis es mediante la interacción de ella misma con los componentes del poro de transición permeable (PTP, por sus siglas en inglés), tal como se esquematiza en la **Figura 23** (Desagher S & Martinou JC, 2000). Basándose en estudios con membranas artificiales, se ha propuesto otro modelo en el que Bax, directamente, forma poros que permiten la liberación de proteínas mitocondriales al citosol para iniciar la apoptosis (Antonsson B, et al. 1997; Basanez G, et al. 1999). Estudios recientes han relacionado la maquinaria de fusión/fisión en la regulación de la apoptosis. La proteína de fisión mitocondrial Drp1 y la de fusión Mfn2 colocalizan con la proteína pro-apoptótica Bax en determinados puntos de la mitocondria, pero no lo hacen otras proteínas implicadas en la morfología mitocondrial (Karbowski M, et al. 2002). La sobreexpresión de Drp1 o Mfn2 *per se* no provocan apoptosis a pesar de modificar la estructura mitocondrial, pero sensibilizan a las células a estímulos apoptóticos (Sugioka R, et al. 2004). En este mismo trabajo se muestra que la represión de Drp1 bloquea el efecto apoptótico, aunque no son los primeros en mostrarlo (Frank S, et al. 2001). Después se comprobó el papel de Drp1 como proteína protectora contra la apoptosis mediada por el exceso de captación de calcio mitocondrial (Szabadkai G, et al. 2004). Ciertos estímulos como la ceramida C<sub>2</sub>, el ácido araquidónico o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducen el movimiento de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplasmático a la mitocondria, provocando un gran incremento en la concentración de calcio citoplasmático, lo que lleva a la permeabilización de la membrana mitocondrial y activación de las caspasas. La entrada de calcio se produce en puntos de la mitocondria yuxtapuestos al retículo endoplasmático y se propaga a través de la red mitocondrial (Bernardi P, 1999).



**Figura 23.** Modelo de dinámica mitocondrial incorporado con la progresión de la apoptosis. La proteína pro-apoptótica Bax es reclutada a la mitocondria y localiza en los mismos puntos donde se reagrupa Drp1 y Bak. Esto provoca la fragmentación de la mitocondria y lo que facilita la desestabilización de las crestas mitocondriales y la liberación del citocromo c. Esquema tomado de Suen DF, et al. 2008.

Como en la vida real, no todo siempre es o blanco o negro. El reclutamiento de Bax a la mitocondria también se ha asociado con la fusión de una forma en la que interviene Mfn2 (Hoppins S, et al. 2011). Esta función se ha focalizado en particular a la acción de los monómeros solubles de Bax que todavía no han formado el PTP. Quizás es porque esta interacción entre Bax y Mfn2, ayuda a dirigir a esta última hacia posibles puntos de

---

reclutamiento de otros factores provocando que la fusión perdure (Martin SJ, 2011). En el **BOX 4** se presenta más información para comprender la unión de conceptos entre la fisión mitocondrial y la apoptosis.

**BOX 4** Relación entre la dinámica mitocondrial y la apoptosis

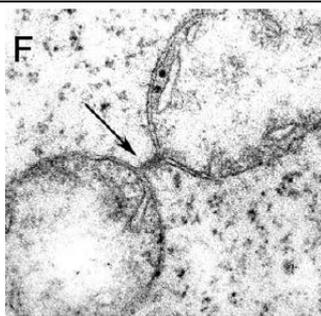
Hace catorce años se reportaron las primeras observaciones que señalaban que las mitocondrias se fragmentaban en exceso durante la apoptosis. Un año después se demostró que sobre-expresando un dominante negativo de Drp1, la principal proteína que media la fisión mitocondrial, para reducir el grado de fragmentación bloqueaba, en parte, la liberación del citocromo c al citoplasma y la apoptosis (Rolland SG & Conradt B, 2010). Estas evidencias asignaron por primera vez una nueva función para Drp1 que estaba ligada a la muerte celular programada.

La teoría aceptada es que bloquear la actividad de Drp1 retrasa la apoptosis. Todo parece apuntar a que la actividad de Drp1 en fisión de las mitocondrias es independiente a su actividad en la muerte celular programada. Contraviniendo estas ideas, hay experimentos que demuestran que Drp1 localiza con el clúster Bax/Bak en la mitocondria (Karbowski M, et al. 2002), justo en los sitios donde se podría estar iniciando la curvatura de la membrana. ¿A qué es debida esta interacción entre Drp1 y las principales proteínas pro-apoptóticas?

En 1968 se describieron por primera vez los genes FtsZ en *Escherichia coli* (Hirota Y, et al. 1968). Estos genes codifican para una amplia gama de proteínas encargadas de promover la invaginación de la membrana celular de las bacterias durante la citoquinesis. Las proteínas FtsZ, igual que las moléculas encargadas de la dinámica mitocondrial, son GTPasas. Los cloroplastos presentan algunas proteínas homólogas a las FtsZ pero, por mucho tiempo, se pensó que las mitocondrias no habrían “heredado” estos genes. No fue hasta el año 2000 cuando se detectó una posible homóloga en la especie de alga *Mallomonas splendens* y más adelante en *Cyanidioschyzon merolae* (Frank S, et al. 2003). A pesar de ello, las proteínas FtsZ no se encuentran en los genomas de hongos, levadura y animales. Esto hace pensar que en estos organismos, el papel de GTPasa ha sido remplazado por Drp1 para encargarse de la división mitocondrial. Las posibles hipótesis que se barajan sobre este cambio de proteína para mantener la función de fisión es que los genes de FtsZ se perdieron en las mitocondrias sin poder transferirse al núcleo (Kuroiwa T, et al. 2006; Rolland SG & Conradt B, 2010).

La división bacteriana y la esporulación utilizan maquinarias proteicas distintas pero superpuestas. Bajo condiciones de crecimiento vegetativo, las bacterias generalmente se dividen por fisión binaria, lo que resulta en una progenie de igual tamaño. En condiciones de crecimiento adversas, como la sequía o la irradiación por UV, ciertas bacterias, como *Streptomyces coelicolor* y *Bacillus subtilis*, son capaces de dividirse de forma asimétrica para producir esporas como una forma de respuesta al estrés (Koonin EV & Aravind L, 2002).

Visto desde una perspectiva evolutiva, la esporulación bacteriana constituye un sorprendente paralelismo con la fragmentación mitocondrial durante la muerte celular programada de las células de mamíferos. Las bacterias, así como las mitocondrias cuando responden al estrés, pueden iniciar los mecanismos de división o fragmentación con la misma maquinaria que media su replicación durante las condiciones de no estrés: la GTPasa FtsZ en el caso de las bacterias y la GTPasa Drp1 en el caso de las mitocondrias (**Figura V**).



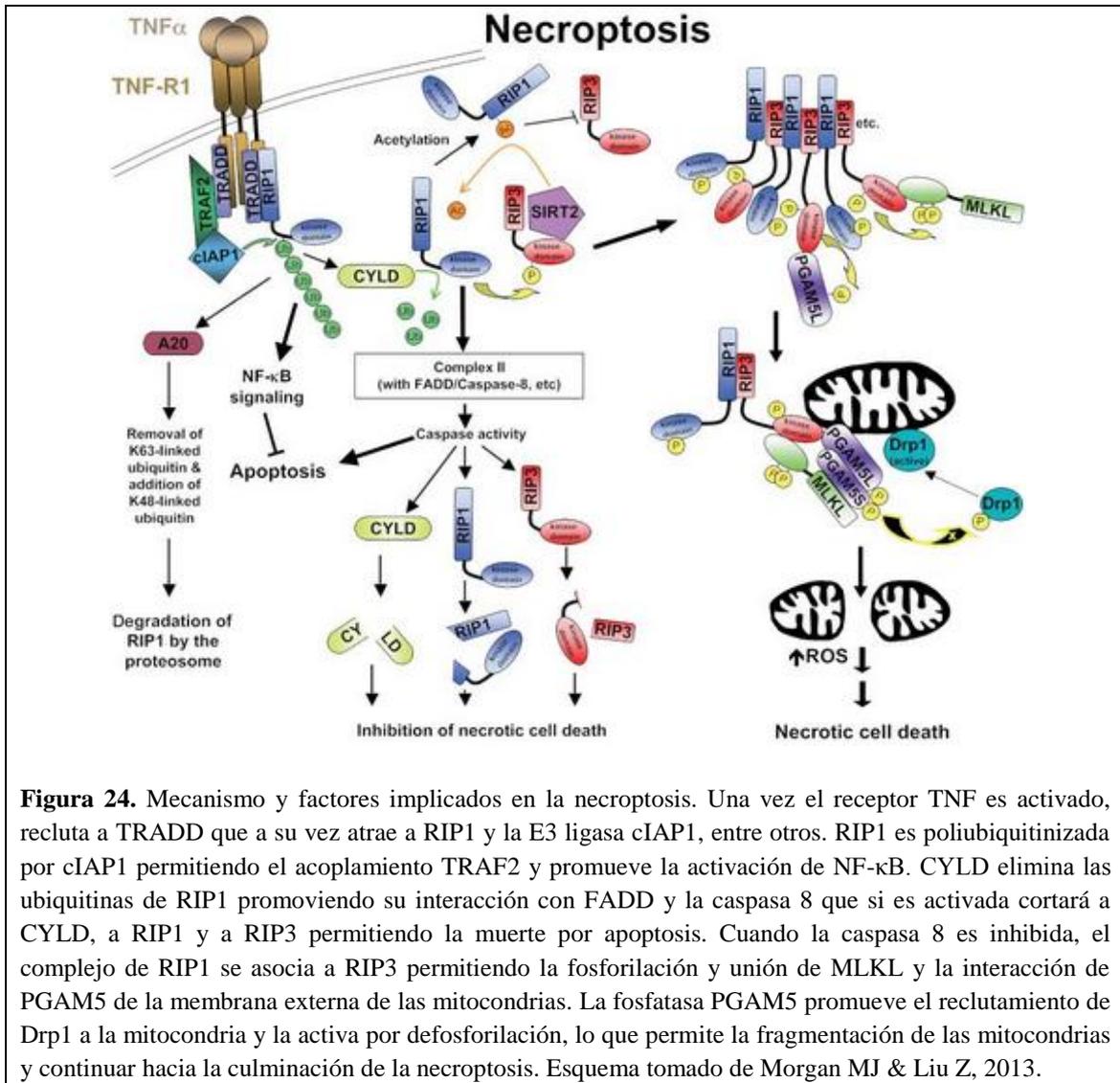
**Figura V.** Anillo de división mitocondrial observado por microscopía electrónica en el mohó *P. polycephalum*. Imagen tomada de Kuroiwa T, et al. 2006.

Todas estas evidencias han alimentado nuestro conocimiento científico y nos han provisto de nuevas pistas sobre la evolución de los procesos de división de estos espléndidos orgánulos. El genoma de la célula huésped controla la división mitocondrial como descendencia de las bacterias. Todos estos datos han sido corroborados por científicos de todo el mundo mediante técnicas de microscopía de fluorescencia y electrónica como también ensayos de *live cell imaging*.

### Mecanismo de necroptosis

El término necrosis proviene del griego ‘*nekros*’, que se traduce en cuerpo muerto. El proceso de necrosis se caracteriza y diferencia a grandes rasgos de la apoptosis por la morfología redondeada que presenta la célula, el volumen que aumenta respecto al normal, la liberación de orgánulos al romperse la membrana plasmática y la fragmentación del ADN (Laster SM, et al. 1988). Esta ruptura de membrana y lisis celular vacía en contenido de la célula al medio. A diferencia de la apoptosis, siempre se ha defendido que la necrosis cursa sin la activación de las caspasas y, por tanto, se equiparaba a una muerte accidental e incontrolada. Pero esto no es del todo cierto, parece ser que la caspasa 8 podría estar regulando negativamente el proceso de necrosis (Vercammen D, et al. 1998; Gunther C, et al. 2011). Cada vez más evidencias científicas están sacando luz al hecho que la necrosis, como todo en la célula, no ocurre porque sí. Se están empezando a definir vías de señalización complejas que se clasifican según el mecanismo de iniciación. La más conocida y estudiada es la que involucra al receptor TNF, esta vía se llama necroptosis (Vandenabeele P, et al. 2010) y está representada en la **Figura 24**. Esta vía de actuación implica las quinasas RIP1 y RIP3 y el proceso en sí puede subdividirse en las fases de preparación, iniciación, propagación, ejecución y lisis. En la necroptosis se aumenta la producción de ROS igual que la peroxidación de lípidos (Holler N, et al. 2000). Un paso muy importante al inicio de la necroptosis es la activación de procesos como proteólisis, fosforilación y, sobre todo, la ubiquitinización y la desubiquitinación. Como ejemplo de este último proceso cabría mencionar a CYLD que se encarga de contrarrestar los efectos de la enzima E3 ligasa pro-supervivencia cIAP1 que marcar a RIP1 para su eliminación y frenar la necrosis. Además, también se promueve la activación de NF- $\kappa$ B para que inhiba la apoptosis a través de la cola de ubiquitinas que se genera en el TNF (Haas TL, et al. 2009). A continuación, RIP1 y 3 forman un complejo multi-dimérico que es fosforilado y activado, haciendo posible el reclutamiento de la fosfatasa PGAM5 (una proteína de la membrana externa de las mitocondrias) y su activación por fosforilación. El *knockdown* de PGAM5 atenúa significativamente el proceso de necroptosis igual que restablece los niveles de ROS y calcio

celular (Wang Z, et al. 2011). PGAM5 activada promueve el reclutamiento de Drp1 a la mitocondria. En esta situación, PGAM5 defosforila el residuo Serina 637 de Drp1 para promover su activación. Este mismo residuo es fosforilado por PKA para inhibir a Drp1 (Cribbs JT & Strack S, 2007). Cuando Drp1 es activada por defosforilación, promueve la fragmentación mitocondrial que también es un paso clave y obligatorio en el avance de la necroptosis.

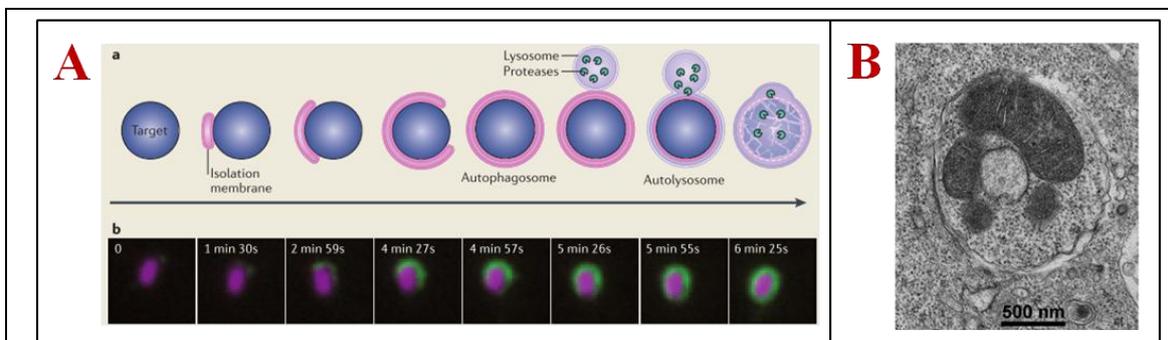


**Figura 24.** Mecanismo y factores implicados en la necroptosis. Una vez el receptor TNF es activado, recluta a TRADD que a su vez atrae a RIP1 y la E3 ligasa cIAP1, entre otros. RIP1 es poliubiquitinizada por cIAP1 permitiendo el acoplamiento TRAF2 y promueve la activación de NF- $\kappa$ B. CYLD elimina las ubiquitininas de RIP1 promoviendo su interacción con FADD y la caspasa 8 que si es activada cortará a CYLD, a RIP1 y a RIP3 permitiendo la muerte por apoptosis. Cuando la caspasa 8 es inhibida, el complejo de RIP1 se asocia a RIP3 permitiendo la fosforilación y unión de MLKL y la interacción de PGAM5 de la membrana externa de las mitocondrias. La fosfatasa PGAM5 promueve el reclutamiento de Drp1 a la mitocondria y la activa por defosforilación, lo que permite la fragmentación de las mitocondrias y continuar hacia la culminación de la necroptosis. Esquema tomado de Morgan MJ & Liu Z, 2013.

## AUTOFAGIA

### Introducción

La palabra ‘autofagia’ fue acuñada y utilizada por primera vez por Christian De Duve en 1956 cuando describieron, gracias al microscopio electrónico, un proceso por el que las células de mamífero digerían su propio citoplasma con la ayuda de lisosomas (De Duve C & Wattiaux R, 1966). La autofagia es un proceso catabólico encargado de suplementar la necesidad energética de la célula mediante el procesamiento de partes de su propio citoplasma. Este proceso juega un papel esencial en la adaptación al ayuno y a las condiciones ambientales cambiantes, a la remodelación celular durante el desarrollo y la acumulación de orgánulos alterados por la acumulación de ROS (Bergamini E, et al. 2007). Durante los años 60 se investigó el origen de la membrana del autofagosoma y la atención se fijó sobre el retículo endoplasmático. Se empezó a describir lo que parecía ser una membrana especializada con componentes y morfología específica al que se llamó fagóforo y parecía ser la membrana precursora del autofagosoma. Era una cisterna de doble membrana, curvada con un lumen translúcido (Reunanen H, et al. 1985). Más adelante, los experimentos mostraron que la composición de estas cisternas era peculiar y especialmente pobre en proteínas. Los primeros descubrimientos bioquímicos se realizaron en levadura y después se expandieron en células de mamífero. En ellos se describieron los primeros genes de las proteínas ATG y sus funciones en la formación del autofagosoma. Con el estudio de líneas celulares humanas fue cuando se vinculó la autofagia con ciertas enfermedades, esto fue en 1999 y en 2004 se obtuvo el primer ratón KO para la ATG5 (Liang XH, et al. 1999; Kuma A, et al. 2004). En la **Figura 25** se muestra la observación del autofagosoma mediante distintas técnicas.



**Figura 25.** Formación del autofagosoma. **A)** La membrana aislada o fagóforo se coloca alrededor de lo que se haya de autofagocitar. Lo rodeará por completo y un lisosoma se fusionará para exponer sus enzimas hidrolíticas al contenido del autofagosoma. La tira de imágenes inferior muestra el mismo proceso a lo largo del tiempo. El color lila es una bacteria y en color verde se marca la proteína LC3. **B)** Observación de un mitofagosoma por microscopía electrónica. Esquema (A) tomado de Lamb CA, et al. 2013; Imagen (B) tomada de Wikipedia.

### Mecanismo de autofagia y proteínas involucradas

En levaduras se han descrito 37 proteínas ATG involucradas en la autofagia. Son enzimas de índole diversa que forman parte de las vías de señalización necesarias para generar el

---

autofagosoma. Al principio se pensaba que la formación de las membranas del autofagosoma se formaban exclusivamente a partir del retículo endoplasmático (ER) en células de mamífero. Esta observación apareció cuando se detectaron diferentes proteínas ATG en el propio ER y se vio que del ER nacía una membrana especializada a la que se llamó fagóforo/omegasoma (Axe EL, et al. 2008). Por otro lado, también se ha sugerido que las membranas de los autofagosomas derivan de la membrana externa de las mitocondrias al comprobar que el citocromo b5 se transfería desde la membrana externa al autofagosoma (Hailey DW, et al. 2010).

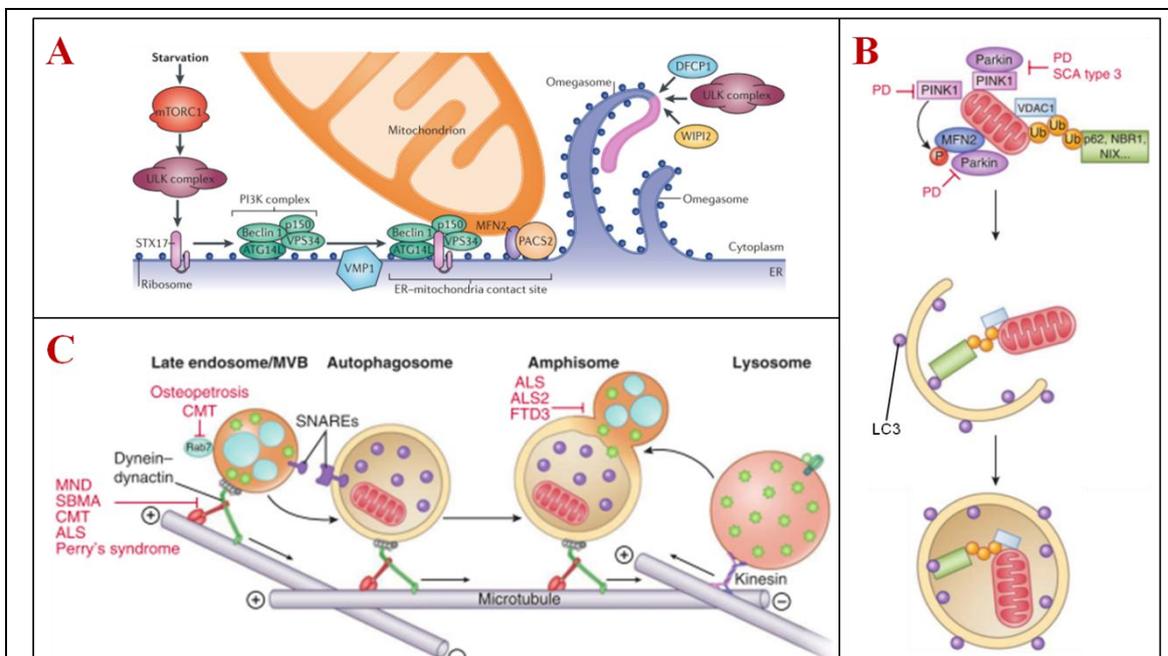
Las investigaciones han podido llegar más allá y ahora tenemos una imagen un poco más aproximada sobre lo que sería la realidad. Esta teoría apareció en la revista *Nature* el 2013 y se defendía que los autofagosomas se forman en los puntos de contacto entre las mitocondrias y el ER, es decir, en las zonas MAM (Hamasaki M, et al. 2013). En la **Figura 26 A** se representa este modelo. Las evidencias surgieron cuando se observó que la proteína ATG5 se acumulaba en un 79% en los puntos de contacto entre ambos orgánulos. Esta proteína se encarga de formar un complejo con otras ATG y se unen a la membrana liberada que formará el autofagosoma. Por aislamiento de partes de las mitocondrias, también se han identificado varias ATG en las zonas MAM. El proceso en sí se inicia cuando una señal llega al ER, vía mTORC1, promoviendo la formación de un complejo proteico que incluye varias proteínas que se van concentrando en las MAM. Cabe recordar que la formación de las MAM es gracias a las Mfn2 que consiguen formar la unión física. Todo el conjunto de proteínas promueven la deformación del ER y crean el omegasoma, la zona de membrana especializada que dará lugar al autofagosoma (Hamasaki M, et al. 2013). Esta nueva formación de membrana requiere la aportación de nuevos componentes y un aumento en la síntesis de lípidos (van Meer G, et al. 2008). Una vez el omegasoma se ha separado del ER, puede recibir fragmentos de membrana y complejos proteicos provenientes de la membrana plasmática, del Golgi y de fragmentos de endosomas (Lamb CA, et al. 2013).

La autofagia selectiva requiere de adaptadores y receptores para poder unir lo que se tenga que eliminar a LC3 que es la molécula asociada a la membrana que englobará la diana convirtiéndose en autofagosoma. Para conseguir completar el proceso, los receptores están provistos de regiones LIR para poder interactuar con las LC3 y también un dominio UBA para poder reconocer las ubiquitininas de dianas que hayan sido poliubiquitinizadas. Estos receptores son proteínas que hacen de puente entre lo que hay que eliminar con la membrana que lo englobará y promoverá su eliminación, por eso contienen secuencias para interactuar con ambos lados (**Figura 26 B**). Un ejemplo de estos receptores y que experimentalmente se utiliza más por Western Blot para ver si hay mucha autofagia o no, es la p62. Además, estos receptores también tienen la habilidad de oligomerizar para poder formar *cluster* o racimo de varias cosas para ser eliminadas. La actividad de p62 puede verse incrementada al fosforilar la Serina 430 y también por la acción de adaptadores como el ALFY (Johnson CW et al. 2012; Lamb CA, et al. 2013). p62, entonces, elimina dianas marcadas por ubiquitininas. Estas ubiquitininas, en caso de tratarse de una mitofagia, son colocadas en sus proteínas dianas por la acción de PINK1 (quinasa) y Parkin (E3 ligasa). PINK1 se activa cuando la funcionalidad de la mitocondria está comprometida y caen los niveles del potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ). Esto permite el reclutamiento de Parkin a la membrana externa de la mitocondria y ubiquitinar distintas proteínas promoviendo que sean reconocidas por p62 que se unirá a LC3 y entonces se promoverá la mitofagia (Geisler S, et al. 2010).

Después de la creación del autofagosoma, éste debe ser fusionado con un lisosoma generando el autolisosoma. Para completar este proceso es importante que ambos cuerpos se encuentren

físicamente. En neuronas, con un axón y unas dendritas tan largas, el proceso es algo más complicado porque requiere de traslados más largos por ambas partes. La mayoría de autofagosomas se generan en los extremos del axón y en varios puntos de las dendritas y deben ser trasladados de forma retrógrada hacia el cuerpo de la neurona (**Figura 26 C**). Durante este traslado por los microtúbulos, los autofagosomas se fusionan primero con endosomas tardíos que son abundantes en las neuritas (Hollenbeck PJ, 1993). Para terminar, hay la fusión con los lisosomas que incluyen proteasas, lipasas y nucleasas al interior del autofagosoma. Todas estas enzimas son pH dependientes, es decir, se activan solamente a pH ácidos de alrededor de 4,5 – 5. Esta acidificación del interior de los lisosomas se consigue con la acción de ATPasas que bombean protones hacia dentro (Stefanis L, et al. 2001).

Como curiosidad cabe resaltar que el transporte y la fusión de los autofagosomas, endosomas tardíos y los lisosomas se da en microtúbulos deacetilados por las HDAC6 justo donde también se ha identificado que ocurre el proceso de fisión mitocondrial (Friedman JR, et al. 2013).



**Figura 26.** Formación del mitofagosoma y la degradación de su contenido. **A)** Modelo de formación del autofagosoma originado en los puntos de contacto entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático (ER). **B)** La mitofagia se inicia cuando PINK1 (quinasa) y Parkin (E3 ligasa) son activadas y ubiquitinizan ciertas proteínas de la membrana externa de las mitocondrias. Esto sirve de diana para p62, una proteína receptora que además interacciona con LC3, una molécula que se encuentra en las membranas especializadas que formarán el fagosoma. PD, Enfermedad del Parkinson. **C)** La eliminación del autofagosoma requiere una primera fusión con un endosoma tardío seguida de la fusión con un lisosoma. Todos los movimientos se dan en microtúbulos acetilados por la HDAC6. MND, enfermedad de las moto neuronas; SBMA, atrofia muscular bulbo-espinal; CMT, Charcot-Marie-Tooth; ALS, esclerosis lateral amiotrófica; FTD3, demencia frontotemporal. Esquema (A) tomado de Lamb CA, et al. 2013; esquema (B, C) tomados de Nixon RA, 2013.

---

## Autofagia y enfermedades neurodegenerativas

El proceso de autofagia presenta varios errores durante su formación en las enfermedades neurodegenerativas crónicas más comunes como el Alzheimer y el Parkinson. Estos problemas sugieren que la autofagia podría tenerse en cuenta para posibles terapias.

Los lisosomas se encargan de eliminar partes o constituyentes celulares obsoletos. El objetivo es reciclar los metabolitos básicos para la nueva síntesis y el almacenamiento de energía. También se ha definido a los lisosomas como controladores para chequear el bien estar de la célula y comprobar su estatus de salud y del ambiente externo (Saftig P & Klumperman J, 2009). La mayoría de desórdenes causados por mutaciones relacionadas con los lisosomas se han vinculado al cerebro y están presentes en muchas enfermedades neurodegenerativas. Como las neuronas tienen esta estructura tan característica con un gran árbol dendrítico y un axón largo, no pueden evitar enfrentarse a obstáculos particulares en la prevención de la aparición de orgánulos disfuncionales. Es importante que los desechos celulares no se acumulen durante mucho tiempo y las neuronas tienen el problema que la gran mayoría de ellas no se dividen, por lo que cualquier cosa acumulada puede ser peligrosa para la viabilidad de la célula. Las neuronas jóvenes logran esta tarea en la limpieza mediante una autofagia muy eficiente, a pesar de las grandes distancias que las numerosas vacuolas autofágicas deben recorrer para llegar a los lisosomas, que se concentran sobre todo cerca de del cuerpo celular (Nixon RA, 2013).

En Alzheimer se ha observado que la formación de autofagosomas se da aparentemente sin problemas pero, a la hora de fusionarlos con lisosomas el proceso falla y el contenido interno no puede eliminarse, acumulándose en la neurona (Nixon RA & Yang DS, 2011). La enzima presenilina tipo 1 (PS1) se encarga, entre otras cosas, de acidificar los lisosomas. En Alzheimer, las PS son unas de las primeras enzimas que se detectan mutadas, por lo que los lisosomas pierden su pH ácido y, por tanto, su funcionalidad. El A $\beta$  que se acumula y los ROS que se generan en esta enfermedad, llevan a la oxidación de lípidos y membranas, fastidiando la funcionalidad de los lisosomas y su integridad, pudiéndose liberar enzimas proteolíticas como proteasas, lipasas y nucleasas desde el interior de los lisosomas al citoplasma promoviendo la necrosis o la apoptosis (Glabe C, 2001).

En una situación normal, cualquier proteína que se agregue es eliminada por macroautofagia. En la enfermedad de Parkinson, la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína se intenta eliminar a través de esta vía pero el sistema se ve imposibilitado. La acidificación de los lisosomas disminuye, se retarda el recambio de proteínas y se pierde la acción de las ATPasas del lisosoma encargadas de crear un ambiente de pH ácido en su interior (Stefanis L, et al. 2001). Mutaciones en los genes que codifican a PINK1 y Parkin causan la acumulación de mitocondrias dañadas en el citoplasma imposibilitando su eliminación por mitofagia y haciendo que la neurona sea muy susceptible a la apoptosis a través de la vía intrínseca o la acumulación excesiva de ROS (Corti O, et al. 2011). También se han identificado problemas a nivel de la quinasa LRRK2 vinculada al Parkinson. Su función alterada durante la enfermedad se ha relacionado con defectos en el tráfico de endosomas y lisosomas, en la generación del pH de los lisosomas y en la regulación del calcio (MacLeod DA, et al. 2013).

En varios trabajos se comenta la posibilidad de utilizar la maquinaria de autofagia como punto de mira para desarrollar nuevos fármacos y poder combatir enfermedades como las que se han comentado aquí. En el caso del Alzheimer y el Parkinson el objetivo sería intentar mejor el

---

proceso de autofagia en sí mismo. Su mejora permitiría a las neuronas ser capaces de utilizar un sistema de eliminación-reciclaje efectivo, disminuyendo así la concentración de proteínas defectuosas y de mitocondrias dañadas en el citoplasma. Esto prevendría la liberación del citocromo c y la muerte por apoptosis (Rubinsztein DC, et al. 2012).

---

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

---

## 1. Modelos animales.

### 1.1 Modelo de isquemia focal.

Estos ensayos fueron desarrollados por el personal del laboratorio del Dr. Julien Puyal de la Universidad de Lausanne.

Todos los animales procesados fueron autorizados por la oficina veterinaria del Cantón de Vaud y estaban en conformidad con las directivas de la Academia Suiza de Ciencias Médicas. Después de la anestesia con 2,5% de isoflurano, la arteria cerebral media (MCA) se tamponó a día 12 días de edad (P12) en ratas macho Sprague-Dawley tal como se ha descrito previamente (Vaslin A, et al, 2009). En pocas palabras, en primer lugar, la principal rama cortical de la MCA izquierda fue cauterizada justo por debajo de su bifurcación en el parietal y las ramas frontales. Entonces, la arteria carótida común izquierda fue ocluida transitoriamente con una abrazadera durante 90 minutos. Las crías de rata se mantuvieron a 37 ° C en la cámara de inducción (2,5% de isoflurano) mientras que la arteria carótida común izquierda se sujetaba. La pinza arterial se retiró una vez transcurrido el tiempo y las crías de rata fueron trasladados de nuevo con su madre hasta el sacrificio.

Las crías de ratas se decapitaron y los cerebros se extrajeron en PBS que contenía 1 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> en hielo. Las cortezas se diseccionaron y se recogieron en tampón de lisis hipotónica de proteínas (20 mmol/L de HEPES, pH 7,4, 10 mmol/L de NaCl, 3 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mmol/L EGTA, 0,1 mmol/L ditiotreitól, 50 mmol/L de NaF, 1 mmol/L de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% de Triton X-100, y un cóctel inhibidor de proteasa (Roche). Los tejidos se homogeneizaron y se sonicaron. La concentración de proteína se determinó utilizando el ensayo de Bradford.

### 1.2 Cruces y ratones utilizados.

Todos los experimentos descritos en los siguientes puntos dentro de este apartado de modelos animales, se llevaron a cabo en ratones Mitofusina 2 (Mfn2)<sup>loxP/loxP</sup> facilitados por el Dr. Antonio Zorzano. Después de varias comprobaciones decidimos cruzar una hembra LoxP<sup>+/+</sup> & Cre<sup>+/-</sup> con unos ratones machos Cre recombinasa tamoxifen inducibles. Actualmente estamos haciendo crecer la colonia para repetir los mismos experimentos.

### 1.3 Genotipación.

Los *pirings* de las orejas de los ratones o las puntas de sus colas se genotiparon para identificar mediante PCR cuáles de ellos expresaban los locus LoxP y el gen CRE (de la enzima CRE recombinasa).

#### A) Soluciones.

- NaOH 50 mM.
- Tris-HCl 1 M pH 6,8.

#### B) Procedimiento.

1. Añadir 0,5 ml de NaOH 50 mM directamente sobre el tejido y calentar 5 minutos a 100 °C.
2. Pipetear el tejido para disgregarlo y dejar calentar 5 minutos más a 100 °C.

3. Añadir 60 µl de Tris-HCl 1 M pH 6,8 y dejar 5 minutos a 100 °C.
4. Centrifugar durante 15 minutos a 13.000 rpm para hacer bajar los restos de tejido.
5. Guardar el sobrenadante, es el ADN.

C) *Reacción de PCR.*

Reactivos necesarios:

- Enzima *GoTaq® qPCR Master Mix* de Promega (cat. A600A) con su *Buffer Green* también de Promega (cat. M791A).
- Mix dNTPs (Invitrogen, cat. 10297-018) 10 mM.
- *Primers forward* y *reverse* 10 µM correspondientes (ver **Tabla 4.4** del **ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS**).
- *RNA free water*.

Procedimiento:

1. Preparar la reacción siguiente teniendo en cuenta un volumen final de, por ejemplo, 25 µl:

Componente	Cantidad
DNA	2 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
<i>Forward primer 10 µM</i>	0,5 µl
<i>Reverse primer 10 µM</i>	0,5 µl
<i>Buffer Green</i>	5 µl
<i>GoTaq® qPCR Master Mix</i>	0,2 µl
<i>RNA free water</i>	16,3 µl

2. Se coloca la reacción en el termociclador y se ejecutan las siguientes condiciones de amplificación:

30 ciclos	
Temperatura	Tiempo
94 °C*	5 min
94 °C	40 s
62,5 °C	1 min
72 °C	20 s
72 °C*	3 min
4 °C*	∞

\*Estos tiempos son los generales de inicio y fin de toda reacción de PCR y no entran dentro de los ciclos.

3. Preparar un gel de agarosa al 1 % (ver punto 4.4 para más detalle), cargar las muestras junto a un marcador de peso molecular y conectar durante 30 minutos a 70 V.
4. Observar el resultado en una cámara oscura con una lámpara de luz UV.

1.4 Tratamiento *in vivo* con NMDA.

---

Algunos de los ratones se utilizaron para ser tratados *in vivo* con la inyección de NMDA o PBS 1X directamente en las cortezas cerebrales para estudiar la expresión de Mfn2 (mediante inmunohistoquímica) y la muerte neuronal (mediante la técnica de Fluoro-Jade C).

A) *Soluciones, reactivos y material.*

- Hidrato de Clorato 3,5 % disuelto en agua. Preparar para administrar 700 mg/Kg de peso del animal.
- Cuadritos de papel gelatinoso Hemostáticos Spongostan de LancetaHG (cat. 061007).
- Soporte Stoelting.
- Material de disección (pinzas, tijeras, bisturí) y soporte especializado.
- Jeringa Hamilton de 5 µl (Teknokroma, cat. HA-84851).
- Mini taladradora con punta redonda.
- Betadine de Meda (cat. 997437.4).
- Solución salina: 75 ml agua, 25 ml PB4X y 20 g de sacarosa.
- PB4X: Preparar 1 litro en agua con 10,6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 56 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .
- Fijador (100 ml): 30 ml PB4X, 25 ml Paraformaldehido 16 % y 45 ml agua MiliQ.
- Criostato Leica CM3050 S.
- Gelatina para portaobjetos en agua MiliQ: 0,5 % de Gelatina Oro y 0,05 % de Cromo III Potasio Sulfato.

B) *Procedimiento.*

1. Desinfectar el material quirúrgico y el soporte donde se trabajará con etanol 70 %. Pesar los ratones a tratar en una balanza y calcular el volumen de anestesia (Hidrato de Clorato 3,5 %) a administrar según el peso del animal.
2. Una vez el animal se haya dormido, sacarle la lengua hacia afuera con unas pinzas para evitar que se la trague y colocarlo en el soporte. Desinfectarle la coronilla con etanol 70 % y rapar el pelo con tijeras.
3. Con la ayuda del bisturí y unas pinzas curvadas, cortar la piel de la cabeza. Separarla hacia los lados para ver mejor el cráneo.
4. Con una pinza pasar un cuadrito de papel gelatinoso (Spongostan) para limpiar la zona.
5. Preparar el NMDA 10 nM en PBS 1X. Procedimiento: Tenemos 20 µl de NMDA 10 mM. Coger 1 µl y diluirlo en 1 ml de PBS 1X. De aquí coger otro µl y ponerlo en otro ml de PBS 1X.
6. Tomar las coordenadas donde se harán las administraciones poniendo la punta de la jeringa Hamilton de 5 µl en Broka 0. Hacer las correcciones de mm necesarias para situarnos encima del área de interés.
7. Perforar el cráneo con una mini taladradora con punta redonda y apartar los restos.
8. Penetrar la aguja ya cargada con el NMDA o el PBS 1X a administrar en los mm necesarios para llegar a la zona de interés y esperar 1 minuto para que se asenté bien.
9. Inyectar 0,1 µl de NMDA 10 mM o de PBS 1X hasta llegar a 0,5 µl con un intervalo entre cada administración de 1 minuto. Al terminar esperar 5 minutos y retirar la aguja muy lentamente.
10. Lavar bien la superficie del cráneo del animal y dejar un papelito de Spongostan empapado de solución salina tapando cada orificio.
11. Coser la piel de la cabeza y poner Betadine.

- 
12. Tapar el animal con papel para que no pierda temperatura y dejar en la jaula con una lámpara encendida.
  13. Dejar transcurrir 24 horas.
  14. Preparar la solución fijador, solución salina y anestésiar al animal con una dosis algo más elevada de Hidrato de Clorato 3,5 %.
  15. Extraer un pedazo de músculo esquelético y congelarlo rápidamente a -80 °C o Nitrógeno líquido.
  16. Hacer la perfusión del animal substituyendo, en primer lugar, la sangre por solución salina y después con solución fijador.
  17. Dejar el cerebro o/n en solución fijador.
  18. Lavar el cerebro 1 hora en PB4X a temperatura ambiente.
  19. Dejar el cerebro o/n en 100 ml de solución salina.
  20. Transcurridos los días, se observa que el cerebro ha incluido la sacarosa del medio al tejido y por el peso ha caído al fondo del recipiente donde esté. Hay que congelar el cerebro con nieve carbónica triturada en polvo y guardarlo a -80 °C.
  21. Cuando se pueda, el tejido se corta en el criostato y los cortes se guardan en potecitos o epp con crioprotector a -20 °C.

C) *Preparación de los portaobjetos.*

1. Preparar la gelatina en agua MiliQ caliente y mantener en agitación constante a 37 °C durante unos minutos.
2. Limpiar los portaobjetos con alcohol 96° desnaturalizado durante unos minutos.
3. Dejar en agua MiliQ para limpiarse unos minutos.
4. Colocarlos en la gelatina durante unos minutos.
5. Cogerlos con pinzas y colocarlos verticales en la tabla para que se sequen. La parte para escribir abajo.

1.5 Extracción de proteína del músculo.

En nuestro caso, a veces ha sido preciso realizar un Western Blot para comprobar que los ratones KO para Mfn2 realmente expresaban menos Mfn2 en el músculo.

A) *Soluciones y material.*

- Homogenizador (tipo *tight-fitting glass-Teflon homogenizer*).
- Buffer de extracción: con Inhibidores de proteasas *Cocktail Set III* de Calbiochem (cat. 539134) 1:200.
- *BCA Protein Assay* (Pierce, cat. 23225).

B) *Procedimiento.*

1. Pesar el tejido en un epp y añadir 0,1 ml de Buffer de extracción por cada 0,02 g de tejido.
2. Homogenizar hasta triturar bien el tejido.
3. Centrifugar 15 minutos a 1200 g a 4 °C y guardar sobrenadante.
4. Centrifugar 10 minutos a 1200 g a 4 °C y guardar sobrenadante.

- 
5. Prueba de BCA cargando 10 µl de las distintas soluciones para hacer la recta y también de las muestras.

#### 1.6 Marcaje por inmunohistoquímica.

Esta técnica se ha utilizado para detectar los niveles de proteína directamente en los cortes histológicos de tejidos obtenidos en el criostato.

##### A) Soluciones y reactivos.

- Solución de bloqueo: Para 10 ml en PBS 1X se necesita 0,15 g de Glicina 0,2 M, 0,36 g de Lisina 0,2 M, 1 ml de Suero de cabra/caballo/asno al 10 %, Triton al 0,1-0,5 % y gelatina al 0,2 %.
- Solución anticuerpo primario y secundario biotinilado en 3 ml de PBS 1X (0,15 ml de Suero de cabra/caballo/asno al 10 %, Triton al 0,2 % y gelatina al 0,2 %).
- ABC: Se prepara 30 minutos antes de su utilización. Componente A Vector Elite (1:100) y Componente B (1:100) en 3 ml de PBS 1X (0,15 ml de Suero de cabra/caballo/asno al 10 %, Triton al 0,2 % y gelatina al 0,2 %).
- Solución reveladora: DAB 0,05 %, sulfato de amonio y níquel 0,005 – 0,01 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,001 – 0,01 %.

##### B) Procedimiento.

1. Lavar los tejidos 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos.
2. Bloquear las enzimas peroxidadas endógenas con metanol 10 % en PBS 1X a 4 °C durante 10 minutos seguido de metanol 10 % y agua 1-3 % en PBS 1X a 4 °C durante 10 minutos más.
3. Lavar los tejidos 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos.
4. Permeabilizar el tejido con PBS 1X-Triton 0,5 % (1,5 ml Triton 10X en 30 ml PBS 1X).
5. Bloquear las uniones inespecíficas con la solución de bloqueo durante 1 hora.
6. Incubación o/n con anticuerpo primario 1:1500.
7. Dejar 2h de incubación más a temperatura ambiente.
8. Lavar los tejidos 3 veces con PBS 1X+Triton 0,2 %+gelatina 0,2 % durante 10 minutos.
9. Incubación de 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado 1:200.
10. Lavar los tejidos 3 veces con PBS 1X+Triton 0,2 %+gelatina 0,2 % durante 10 minutos.
11. Incubación con ABC durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad.
12. Lavar los tejidos 3 veces con PBS 1X+Triton 0,2 %+gelatina 0,2 % durante 10 minutos.
13. Lavar los tejidos 3 veces con fosfato 0,1 M (diluir 4 veces el PB4X en agua) durante 10 minutos.
14. Añadir solución reveladora con DAB durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
15. Lavar los tejidos 3 veces con fosfato 0,1 M durante 10 minutos.
16. Montar los cortes de tejido sobre portaobjetos gelatinizados.

#### 1.7 Marcaje por inmunofluorescencia con Fluoro-Jade C.

---

La técnica de marcaje con Fluoro-Jade C se utiliza para marcar todas las neuronas en proceso de degeneración, es decir, las que se encuentran en proceso de muerte y las ya muertas en tejido. A diferencia de los otros tipos de Fluoro-Jade, el tipo C es el que presenta el mejor marcaje en comparación con el ratio del *background* además de una resolución también mayor. Esto permite que con esta técnica se puedan marcar, además de los cuerpos neuronales, las dendritas, el axón e incluso las terminales. No presenta problemas al utilizarse con otros marcadores e incluso con DAPI. El procedimiento seguido se basa en el trabajo de Schmued L y colaboradores (Schmued L, et al. 2005).

A) *Soluciones y reactivos.*

- Fluoro-Jade C de Histo-Chem Inc. (cat. 1FJC). La solución de trabajo se prepara añadiendo 1 ml de la solución *stock* en 99 ml de ácido acético vehículo 0,1 %.
- Solución básica de alcohol: En 80 ml de alcohol absoluto añadir 20 ml de NaOH 1 %.

B) *Procedimiento.*

1. Los cortes de tejido se montan en portaobjetos gelatinizados y se dejan secar a 50 – 60 °C durante 30 minutos.
2. Sumergir los portaobjetos en una solución básica del alcohol durante 5 minutos.
3. Transferir los portaobjetos a etanol 70 % durante 2 minutos y después pasarlos a agua destilada durante 2 minutos más.
4. Incubarlos durante 10 minutos en permanganato de potasio 0,06 % y pasar 2 minutos en agua destilada.
5. Incubarlos durante 10 minutos en Fluoro-Jade C 0,0001 % disuelto en ácido acético vehículo 0,1 % y 1 ml de DAPI 0,01 %.
6. Lavar los portaobjetos 3 veces durante 1 minuto en agua destilada.
7. Dejarlos secar a 50 – 60 °C durante 1 – 2 horas.
8. Transcurrido el tiempo, aclarar los portaobjetos con una inmersión de 1 – 5 minutos en xileno.
9. Colocar cubreobjetos con un medio de montaje no acuoso ni con glicerol, sin fluorescencia y con base de estireno.

## **2. Cultivos primarios de neuronas corticales de rata.**

### 2.1 Condiciones generales

Los cultivos primarios de neuronas corticales se prepararon siguiendo un protocolo riguroso ya establecido (Banding H and Greenberg ME, 1991) a excepción que el medio de crecimiento utilizado fue el NBA. Se ha trabajado con embriones a día 19-20 de gestación de ratas Sprague Dawley (SD). Las SD son unas ratas albinas que se utilizan ampliamente en investigación. Se caracterizan por ser tranquilas y fáciles de manejar. Su nombre proviene de las granjas Sprague Dawley en Madison, Wisconsin (EUA), donde fue producida en 1925.

Las ratas SD se han obtenido del Estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Ellos se han encargado de gestionar los cruces a tres semanas vista de modo que cada lunes hemos podido tener a nuestra disposición una rata con embriones a 19-20 días de gestación. Para generar cultivos primarios, es muy importante contar con neuronas capaces de

---

sobrevivir tras todo el proceso de disgregación enzimática y mecánica que debe llevarse a cabo para generar el cultivo. Las neuronas de ratas recién nacidas o adultas, no poseen la plasticidad necesaria para poderse utilizar. Por eso se trabaja con embriones.

La rata muere por asfixia con gas carbónico de una forma rápida. La extracción de los embriones se ha llevado a cabo en las mismas instalaciones del Estabulario. Una vez obtenidos, los embriones son sumergidos en medio de disociación (DM) con Kynurinate Magnesium (K) y trasladados rápidamente al laboratorio. La extracción de ambas cortezas cerebrales se ha llevado a cabo en campanas de flujo laminar debidamente esterilizadas con rayos U.V. y etanol al 70%. El material fungible estéril utilizado (pipetas, tubos de centrifuga, placas de cultivo, etc.) se ha comprado a las casas Corning o BD Falcon, indistintamente.

## 2.2 Medios y reactivos generales.

- Medio OptiMEM I de Gibco (cat. 31985-047): Se añade 4ml Glucose 2,5M (45%) y 5ml Penicilina/Estreptomocina (P/E).
- Medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 4,5 g/l Glucose de Lonza (cat. Be12-614F).
- Medio Minimum Essential Medium 1X (MEM) de Gibco (cat. 21090-022).
- Medio Neurobasal<sup>TM</sup>-A Medium (NBA) de Gibco (cat. 10888-022): Se añade Serum 1%, P/E, B-27 supplement 1x de Gibco (cat. 17504-044-10 ml) y Glutamina 1mM.
- Solución SGG: MgCl<sub>2</sub> 2M, CaCl<sub>2</sub> 1M, Hepes 1M de Sigma (cat. H0887-100 ml), Phenol Red 0,5% de Sigma (cat. P0290-100 ml), Glucose 2,5M (45%) de Sigma (cat. G8769-100 ml), NaCl 5M de Sigma (cat. S5150-1 l), NaHCO<sub>3</sub> 7,5% de Sigma (cat. S8761-500 ml), KCL 3M, Glycina 1M y Piruvato sódico 0,1M de Sigma (cat. S8636).
- Medio TM<sub>O</sub>: SGG, MEM y P/E.
- Medio TM<sub>ITS</sub>: SGG, MEM, P/E e Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Media Supplement (ITS) de Sigma (cat. I1884).
- AraC (Cytosine β-D-arabinofuranoside hydrochloride) de Sigma (cat. C6645-100mg).
- Suero bovino fetal (FBS) de Gibco BRL. Previamente a su utilización se inactiva calentándolo a 56 °C durante 30 minutos. El suero inactivado (FBS inactivado) se alicuota en tubos estériles de 50 ml y se guarda a -20 °C o bien a 4 °C si se va a utilizar inmediatamente.
- Penicilina/Estreptomocina (BioWhittaker o Gibco BRL) 10.000 U/ml: 10.000 µg/ml.
- Betadine de Meda (cat. 997437.4).

## 2.3 Preparación del *coating*.

Para asegurar que las neuronas corticales puedan adherirse eficientemente, es necesario preparar las placas de cultivo con una película o *coating*, compuesta de Poli-D-Lisina (PDL) y Laminina. La PDL es una molécula sintética que no estimula la actividad biológica en las células cultivadas en ella y no introduce impurezas transportadas por polímeros naturales. La laminina es una proteína importante de la lámina basal. Son glicoproteínas heterotriméricas con regiones de unión al colágeno, integrinas, dominios celulares y proteoglicanos. La combinación de ambos crea un *coating* que permite la adherencia de las neuronas sin interferir en sus procesos celulares básicos. Se trabaja en la campana de flujo laminar en las condiciones previamente explicadas.

---

A) *Soluciones y reactivos.*

- Agua bidestilada autoclavada.
- Laminina de Sigma (cat. 21090-022-500 ml).
- Poli-D-Lisina de BD Biosciences (cat. 354210) o Sigma (P7886-271106).

B) *Procedimiento.*

1. Se descongela la PDL y la Laminina en un baño a 37 °C. Ambos se utilizan a una concentración de 1 mg/ml.
2. Se calcula el volumen total de *coating* a preparar teniendo en cuenta cuántas placas se querrán utilizar. Por ejemplo, para placas de 24 pocillos, utilizamos 0,5 ml de *coating*. Llenamos una botella con el volumen total de agua bidestilada autoclavada.
3. Cuando la PDL y la Laminina se han descongelado, se añaden los volúmenes necesarios al agua. Para 75 ml se requiere 1 ml de PDL y 0,375 ml de Laminina.
4. Se mezcla todo el contenido y se vierte la cantidad necesaria en cada placa. Se guardan todas en el incubador a 37 °C durante 2 horas antes de sembrar las neuronas.

2.4 Preparación de la solución de disección.

La solución de disección se utilizará para transportar los embriones recién extraídos desde el Estabulario hasta el laboratorio. También será donde se depositarán y diseccionarán las cortezas cerebrales a medida que se vayan obteniendo. Se trabaja también en la campana de flujo laminar.

A) *Soluciones y reactivos.*

- Medio de disociación (DM): Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25M, MgCl<sub>2</sub> 2M, CaCl<sub>2</sub> 1M, Hepes 1M, Phenol Red 0,5% y Glucose 2,5M (45%).
- *Kynurinate Magnesium (K)* de Sigma (cat. K3375).
- Agua bidestilada autoclavada.
- NaOH 1M.
- Phenol Red 0,5% de Sigma (cat. P0290-100 ml).
- HEPES 1 M y 100 mM, pH 7,4.
- MgCl<sub>2</sub> 2M.

B) *Preparación de Kynurinate Magnesium (K).*

Para preparar 80 ml, utilizamos un falcon de 50 ml:

1. Pesar 158,56 mg de K (K = 198,2 MW).
2. Añadir 5 ml H<sub>2</sub>O bidestilada y autoclavada; después 0,4 ml de Phenol Red 0,5% y, a continuación, 100 µl de NaOH 1M. *Vortex* extensamente.
3. Para que la solución vaya turnando de color amarillo a rosáceo, hay que ir añadiendo 100 µl de NaOH 1M e ir mezclando continuamente.
4. Cuando la K se ha disuelto y el pH se haya turnado rosáceo, añadir 0,4 ml de Hepes 1M a pH 7.4 y mezclar bien.
5. Añadir 4 ml de MgCl<sub>2</sub> 2M y mezclar bien.

- 
6. Pasar toda la solución a una botella y añadir agua bidestilada autoclavada hasta los 80 ml.
  7. Filtrar los 80 ml en filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ , alicuotar cada 4 ml y guardar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

C) *Procedimiento.*

Para 40 ml de solución de disección, utilizamos un falcon de 50 ml:

1. A 36 ml de medio de disociación (DM) se añaden 4 ml de K descongelado previamente en el baño a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
2. Se corrige el pH de la solución para tornarlo rosáceo utilizando NaOH 100 mM. Se debe ir con cuidado para no pasarse, con 100 – 200  $\mu\text{l}$  suele ser suficiente. En caso de obtener un pH de color lila, la solución debe descartarse y empezar de nuevo. No se debe añadir  $\text{H}^{+}$  para equilibrarlo.
3. Guardar la solución a temperatura ambiente dentro de la campana hasta que se vaya a buscar los embriones al Estabulario.

2.5 Preparación de la solución de papaína.

La papaína (E) se utiliza para la disgregación enzimática de los tejidos.

A) *Soluciones y reactivos.*

- Medio de disociación (DM):  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1M,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,25M,  $\text{MgCl}_2$  2M,  $\text{CaCl}_2$  1M, Heps 1M, Phenol Red 0,5% y Glucose 2,5M (45%).
- *Kynurinate Magnesium* (K) de Sigma (cat. K3375).
- L-Cisteína.
- NaOH 1M.
- Latex de papaína de Worthington Biochem (cat. 3126).
- Agua bidestilada autoclavada.

B) *Preparación de la papaína.*

Para preparar 50 ml, utilizamos una botella de 250 ml:

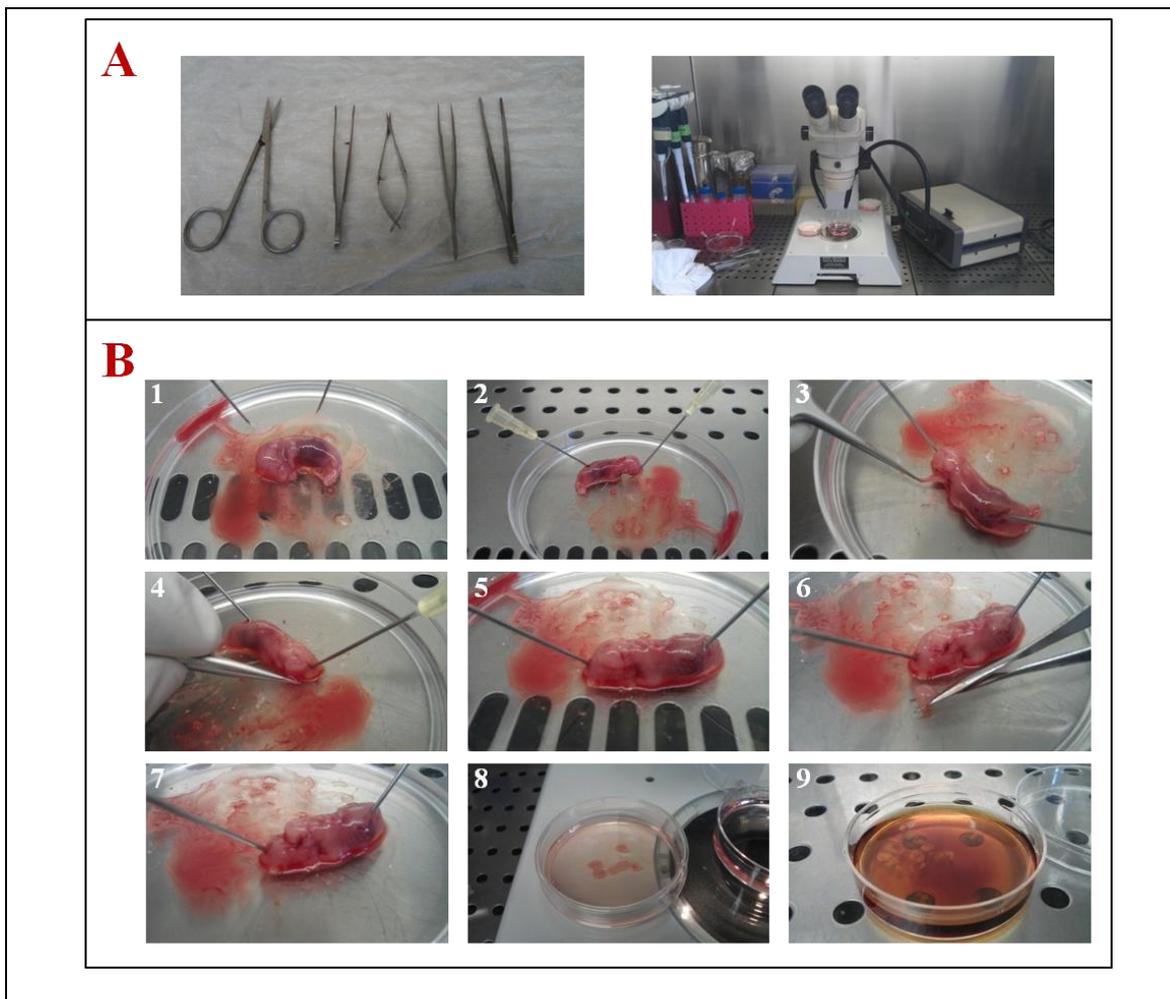
1. A una botella de 250 ml se añaden 45 ml de medio de disociación y 5 ml de K.
2. A continuación se añaden 22,5 mg de L-Cisteína (alrededor de 20 granos).
3. Añadimos NaOH 1M hasta que el pH se vuelve rosáceo.
4. Se añaden 500 unidades de papaína (430  $\mu\text{l}$ ) utilizando una punta azul de pipeta.
5. Se baña la botella en el baño a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  para dejar que se caliente, de esta forma se deshace la papaína. No hay que dejar que la botella alcance los  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , simplemente bañarla durante un par de minutos y después sacarla para dar un *vórtex* largo. Repetir todas las veces que sea necesario hasta que la papaína se haya disuelto por completo.
6. Filtrar los 50 ml en filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ , alicuotar cada 4 ml y guardar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
7. En el momento de utilizarla ésta debe ser calentada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  más de 30 minutos antes de añadirla a los tejidos.

2.6 Extracción de las cortezas cerebrales de rata.

Como ya se ha comentado con anterioridad las ratas se encuentran en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. El personal técnico del estabulario es el encargado de sacrificar la rata gestante con CO<sub>2</sub>. De esta forma nosotros podemos trabajar en uno de sus laboratorios y proceder con la extracción de los fetos de 19-20 días de gestación. Antes de esto es imprescindible asegurarnos que la rata está muerta. Para ello medimos varios reflejos como el óptico-palpebral y la contracción de las patas por un estímulo de presión-dolor. Los fetos extraídos son sumergidos en la solución de disección y transportados al laboratorio.

En todo momento se trabaja con material quirúrgico lavado. La disección de las cortezas cerebrales se realiza en campanas de flujo laminar bien esterilizadas.

1. A medida que se obtienen las cortezas, estas se van depositando en una placa con solución de disección.
2. Al finalizar la extracción se utiliza una lupa y una fuente de luz para poder extraer el *corpus callosum* (substancia blanca) o fibras nerviosas de las cortezas y también las meninges.
3. Terminado este proceso, se colocan las cortezas en PBS 1x con una concentración del 5% de Betadine durante 5 minutos para eliminar cualquier posible contaminación oportunista que haya podido aparecer durante todo el proceso previo. En la **Figura 27** se muestra la lupa y el material quirúrgico utilizado. También se representa una secuencia de fotografías del proceso de extracción de las cortezas de los embriones de rata.

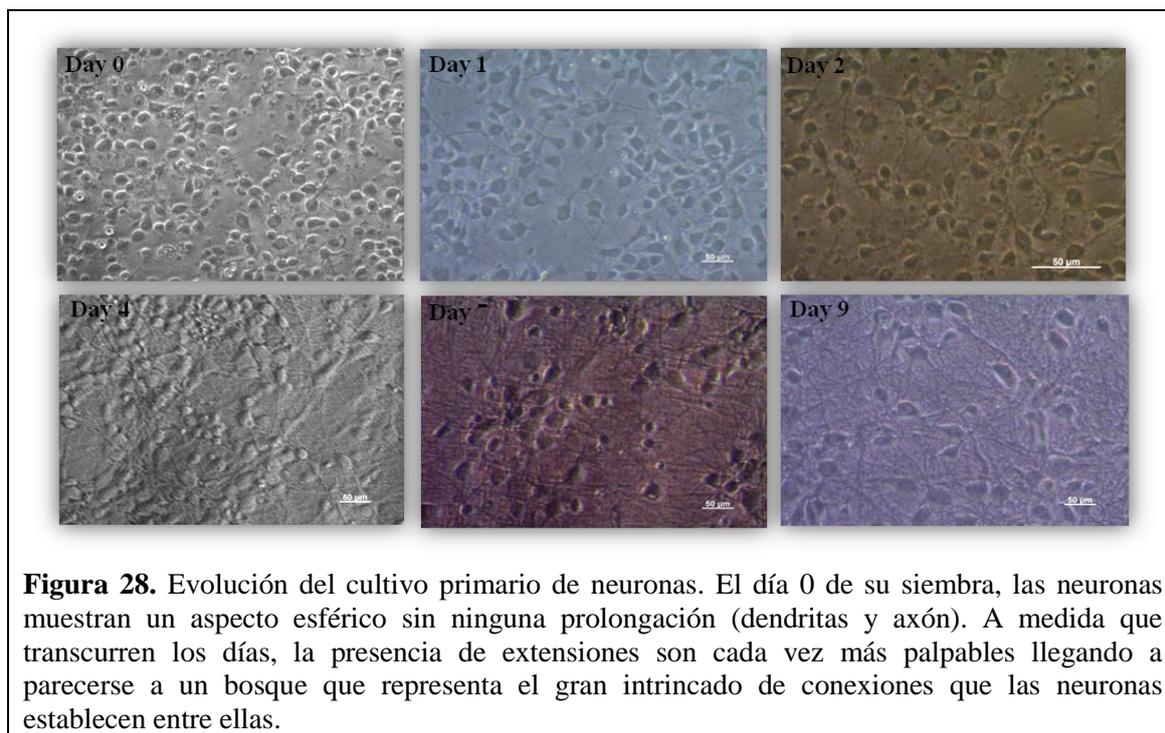


---

**Figura 27.** Extracción de las cortezas cerebrales de rata. **A)** Las dos imágenes superiores muestran el material quirúrgico utilizado y los instrumentos con los que se ha trabajado, en este orden. En la secuencia inferior de 8 imágenes, **B)**, se representa el proceso de extracción de las cortezas.

4. Tras estos minutos se colocan las cortezas en 2 ml de solución de papaína (E) para iniciar la disgregación enzimática del tejido en dos incubaciones de 20 minutos en el baño de 37 °C. Entre una y otra es preciso retirar la E y añadir 2 ml frescos para la segunda incubación.
5. Durante este tiempo se recomienda colocar el volumen necesario de medio OptiMEM I que se va a utilizar para sembrar en el baño a 37 °C.
6. Al mismo tiempo se debe eliminar por aspiración el *coating* de las placas preparadas. Es muy importante no dejar ningún resto. Para ello se debe añadir agua bidestilada autoclavada para terminar de limpiar o dejar las placas verticales para dejar que el *coating* vaya resbalando y aspirarlo de nuevo.
7. Transcurridos los 20 minutos de la segunda incubación con la E, eliminamos toda la solución posible y se añaden 2 ml de medio de disociación más *Kynurinate Magnesium* (DM+K). Se sujeta el tubo horizontal y se gira lentamente para lavar el enzima de las paredes del tubo. Se hacen 2 lavados.
8. A continuación, lavar dos veces con 2 ml de 1 % de medio de crecimiento NBA. Agitar para mezclar manteniendo cada tubo horizontal y girarlo lentamente para lavar las paredes del tubo, igual que en el paso anterior.
9. Retirar el NBA del último lavado y añadir 2 ml más. Con una pipeta de 2 ml se pipetea arriba y debajo de forma rápida durante 50-60 veces para llevar a cabo la disgregación mecánica del tejido.
10. Se deja reposar el tubo durante un par de minutos para dejar que cualquier fragmento pequeño que no haya podido ser disgregado, caiga al fondo. Toda la parte acuosa se pasa al OptiMEM I atemperado a 37 °C teniendo cuidado de no arrastrar ningún resto.
11. Se añaden 2 ml más de medio NBA al mismo tubo y se repite el pipeteo de 50-60 movimientos.
12. Una vez terminado se pasa todo al OptiMEM I y se siembran todas las placas preparadas. Para placas de 24 pocillos se utilizan 0,5 ml de medio por pocillo.
13. Incubar durante 2,5 horas a 37 °C.
14. Después de este tiempo las neuronas ya han podido adherirse al *coating* de las placas. De modo que se procede con la retirada del OptiMEM I y se añade medio de crecimiento NBA.
15. Se deja crecer en el incubador a 37 °C.
16. Transcurridos 4 días añadimos 1 ml (en el caso de placas de 24 pocillos) extra de medio de crecimiento NBA a los cultivos sin retirar el que ya llevan. Al NBA se añade AraC, un inhibidor de la replicación del DNA que se utiliza para frenar el crecimiento de las células gliales del cultivo.  
El AraC de Sigma se prepara en un *stock* a 0,24 M en agua. La concentración utilizada para añadir a los cultivos es de 1,2 mM.
17. Cuatro días más tarde el medio NBA es cambiado a  $TM_0$  o  $TM_{ITS}$  según el interés de los experimentos. Así se podrán iniciar los tratamientos necesarios.  
En la **Figura 28** se muestra el aspecto de las neuronas del cultivo primario. Los 9 días de crecimiento son muy importantes para dejar que las neuronas potencien sus

conexiones sinápticas, hagan crecer su árbol dendrítico y expresen en las membranas el receptor NMDA de forma funcional.



### 3. Cultivos celulares.

#### 3.1 Condiciones generales.

La manipulación de las líneas celulares se ha llevado a cabo siguiendo las condiciones habituales de esterilidad para minimizar cualquier riesgo de contaminación. En todo momento se ha trabajado en campanas de flujo laminar. La superficie de trabajo se ha tratado con etanol al 70% tanto al inicio como al final de cada protocolo, además de ser irradiada con rayos U.V. cuando la campana no estaba siendo utilizada. Igual que con los cultivos primarios de neuronas, el material fungible estéril utilizado se ha comprado a las casas Corning o BD Falcon, indistintamente. Las soluciones utilizadas (medio de cultivo DMEM, antibióticos, reactivos, etc) se han comprado estériles con calidad para uso en cultivos celulares a Gibco BRL o a BioWhittaker. Algunos reactivos se han esterilizado en autoclave o bien por filtrado (usando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro, Biofil).

#### 3.2 Línea celular utilizada.

La línea celular utilizada ha sido básicamente la HEK 293. Las células 293 son células de riñón embrionario humano que fueron originariamente transformadas con DNA procedente de adenovirus de tipo 5 (Ad5) por el Dr. Graham (Graham et al. 1977). Estas células contienen y expresan la región E1 (*early region 1*) del Ad5 y por tanto permiten el crecimiento de adenovirus deficientes en E1. Se han utilizado para la validación de varias pruebas antes de utilizarlas en los cultivos primarios de neuronas y, también, para la propagación y titulación de

---

adenovirus recombinantes por parte del Dr. Francesc X. Soriano. Se obtuvieron de la ATCC (cat. CRL-1573) y se mantuvieron siguiendo las condiciones generales de cultivo.

### 3.3 Medios y reactivos generales

Soluciones generales:

- Medio DMEM de Lonza (con 4,5 g/l de glucosa, con glutamina).
- Suero bovino fetal (FBS) de Gibco BRL. Previamente a su utilización se inactiva calentándolo a 56 °C durante 30 minutos. El suero inactivado (FBS inactivado) se alicuota en tubos estériles de 50 ml y se guarda a -20 °C o bien a 4 °C si se va a utilizar inmediatamente.
- Penicilina/Estreptomina (BioWhittaker o Gibco BRL) 10.000 U/ml: 10.000 µg/ml.
- HEPES 1,25 M pH 7,4; filtrado a través de filtros 0,22 µm y guardado a -20 °C.
- Tripsina (Gibco BRL).

Preparación de medios y reactivos:

- Medios completos: Sobre un volumen de 500 ml de medio DMEM se añaden los siguientes reactivos a la concentración final indicada:
  - HEPES 25 mM (dilución 1/50 del *stock*). Esto proporciona un sistema adicional de tamponamiento del medio además del que proporciona el incubador de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>).
  - Penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml (dilución 1:100 del *stock*).
  - Suero bovino fetal inactivado. Se añade al 10% (v/v) para el medio de crecimiento y al 2% (v/v) para el medio de diferenciación.

Habitualmente se prepara un volumen de 500 ml de medio que se conserva a 4°C hasta un máximo de 4-6 semanas. Los medios se calientan a 37°C antes de añadirlos a las células para evitar someterlas a estrés térmico.

### 3.4 Técnicas generales.

El trabajo con líneas celulares comporta su mantenimiento (descongelación y amplificación) y su conservación (por congelación).

#### A) *Descongelación de células.*

Las células pueden conservarse en criotubos en tanques de nitrógeno líquido durante años. Para periodos más cortos (semanas o meses), se pueden conservar a -80°C. Para su descongelación generalmente hemos utilizado el siguiente protocolo:

1. Se descongela rápidamente el vial (criotubo) a 37°C.
2. Se añade el contenido del vial a un tubo de centrifuga de 15 ml con 5-10 ml de medio completo.
3. Se centrifuga a 1.200 rpm (260 g) durante 4 minutos.

- 
4. Se elimina el sobrenadante. Estos últimos 3 pasos sirven para eliminar los restos de DMSO (crioprotector) que hay en el medio de congelación (ver apartado C).
  5. Resuspendemos el *pellet* en un volumen adecuado de medio completo (5-10 ml).
  6. Se siembra la resuspensión en un frasco, o placa, de superficie adecuada. Si el cultivo es reciente y se espera una alta viabilidad de las células se puede sembrar en un frasco de 75 cm<sup>2</sup>; si, por el contrario, se trata de un cultivo congelado hace mucho tiempo es conveniente sembrarlo en una placa de 3,5 cm<sup>2</sup> de diámetro o en un frasco de 25 cm<sup>2</sup>. Esperamos que las células lleguen a un 75-80% de confluencia y procedemos según los protocolos de mantenimiento de la línea celular (ver apartado B).

#### B) *Mantenimiento de cultivos celulares.*

Una vez que tenemos un cultivo en crecimiento, nos interesa mantener las células en división o bien amplificarlas. Con el tipo celular que se ha utilizado, se debe prevenir un exceso de confluencia ya que estas células pueden alterar sus características bioquímicas y funcionales, e incluso perder la capacidad de diferenciarse si sobrepasan una confluencia del orden del 80 u 85%. El procedimiento que utilizamos para despegar las células de un frasco de 75 cm<sup>2</sup> y mantener el cultivo es la proteasa tripsina y el protocolo es el siguiente:

1. Se aspira el medio en que las células están creciendo.
2. Se lavan con PBS (unos 10 ml). Se procura no verter con fuerza el líquido sobre las células para no arrancarlas del frasco. El EDTA presente en esta solución secuestra los iones Ca<sup>2+</sup> necesarios para el mantenimiento de la adhesión celular al sustrato.
3. Se añade 1 ml de tripsina. Cuando se han utilizado frascos o placas de superficie diferente, este volumen se ha variado proporcionalmente.
4. Se agita suavemente el frasco o placa para repartir la tripsina. A continuación, se puede dejar el frasco o placa a temperatura ambiente o introducirlo en el incubador a 37°C durante 1 minuto mientras la tripsina actúa. Cuando las células se despegan, y si hay un alto grado de confluencia, puede verse a simple vista una masa blanquinosa flotando en el líquido que son las células despegadas. Se puede también comprobar al microscopio que efectivamente hemos conseguido despegar las células de la superficie de plástico. Conviene no prolongar el tiempo de exposición de las células a la tripsina, ya que esta proteasa puede llegar a digerir las proteínas de la superficie celular (receptores, transportadores,...) y comprometer su viabilidad.
5. Se añaden 10 ml de medio o DMEM completo (proporción 1:10 del volumen de proteasa añadido) para diluir la tripsina.
6. Se diluyen las células hasta una concentración adecuada según las necesidades. Por ejemplo: si queremos amplificar un cultivo de células HEK 293 sembraremos del orden de 400.000 células por frasco de 75 cm<sup>2</sup>.
7. Se siembra el volumen de células correspondiente en la placa o el frasco.

#### C) *Congelación de células.*

Los cultivos celulares se pueden mantener durante largo tiempo congelados en nitrógeno líquido. Es conveniente mantener *stocks* de células congeladas de un número bajo de pases de mantenimiento, ya que los cultivos tienden a envejecer y a perder sus características bioquímicas y morfológicas con las subdivisiones y sucesivos tratamientos con tripsina.

---

Además conviene tener cultivos congelados en previsión de posibles contaminaciones en el cultivo con el que se está trabajando. El protocolo utilizado para la congelación es el siguiente:

1. Se recupera el cultivo en crecimiento por tripsinización como se explica en el apartado B.
2. Se vuelve a centrifugar a 1.200 rpm (260 g) durante 4 minutos.
3. Se resuspenden las células en una solución de DMSO de Sigma (cat. D2650) diluido al 10% en FBS a una concentración de aproximadamente  $10^6$  células/ml. El DMSO actúa de crioprotector; a pesar de ello debe evitarse una exposición prolongada de las células a este producto a temperatura ambiente ya que resulta tóxico.
4. Se alicuota esta suspensión en volúmenes de 1 ml en criotubos de 1.8 ml (previamente colocados en hielo), indicando el número de procesos de tripsinización que ha sufrido el cultivo, la cantidad de células congeladas, el tipo celular y la fecha de congelación.
5. Se almacena inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  y al día siguiente se pasa al tanque de nitrógeno líquido. Alternativamente se puede congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  y al cabo de unas horas pasarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$  y al día siguiente pasarlo a nitrógeno líquido, en un proceso de congelación progresivo menos dañino para las células.
6. Una vez que el vial está congelado se puede conservar durante semanas a  $-80^{\circ}\text{C}$  o bien se conserva en el tanque de  $\text{N}_2$  líquido durante períodos más largos.

#### 4. Técnicas generales de manipulación del DNA.

El trabajo con DNA y bacterias implica la utilización de material esterilizado para evitar contaminaciones con DNAsas, con otras bacterias y con DNA ajeno. La manipulación de bacterias se ha realizado siempre en las proximidades de un mechero Bunsen que nos proporciona un área estéril de trabajo. El material fue autoclavado a 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos para esterilizarlo e inactivar las DNAsas que pudiera haber. Los reactivos utilizados eran de calidad para Biología Molecular y el agua empleada para prepararlos de calidad ultrapura (sistema Milli-Q de Millipore). El pH de las soluciones se ajustó antes de ser esterilizadas mediante autoclavado o filtración (filtros de  $0,22\ \mu\text{m}$   $\varnothing$  de poro).

##### 4.1 Bacterias competentes.

Para mantener y amplificar los plásmidos, éstos han sido transformados en las cepas JM109 E. coli desarrolladas por Promega (cat. P9751).

###### 4.1.1 Transformación.

En la **Tabla 4.3** del **ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS** se resumen todos los vectores que se han obtenido de otros laboratorios o se han comprado y han sido transformados para su posterior transfección a células HEK 293 o cultivos primarios de neuronas.

Las bacterias competentes pueden incorporar fácilmente DNA exógenos. Esto facilita la amplificación o la selección de los plásmidos recombinantes que nos interesan. El protocolo seguido ha sido el siguiente:

- 
1. A 50 µl de bacterias competentes añadimos el DNA que queremos transformar. Para transformar plásmidos se utilizan cantidades inferiores a 50 ng. Para productos de ligación hemos añadido 1/2 o todo el volumen de la reacción de ligación (entre 5 y 10 µl).
  2. Lo mezclamos y lo mantenemos en hielo durante 30 minutos. Esto permite la adsorción del DNA a la superficie de la bacteria.
  3. Lo incubamos a 42°C durante 60 segundos.
  4. Añadimos 1 ml de medio LB y lo incubamos a 37 °C durante 1 h. Agitamos ocasionalmente los tubos. Durante este tiempo las bacterias que han incorporado el plásmido expresan la resistencia al antibiótico que permite su selección.
  5. Concentramos el cultivo por centrifugación en un tubo eppendorf a velocidad máxima durante 2 minutos.

#### 4.2 Recuperación del DNA.

Para purificar los plásmidos a partir de los cultivos bacterianos hemos utilizado equipos comerciales según la cantidad de DNA que se necesitaba: minipreps para fines analíticos y midiprep y maxiprep para la obtención de grandes cantidades de DNA.

##### 4.2.1 Miniprep.

En esta tesis se han utilizado para preparación de todo tipo de DNA plasmídico kits comerciales de la casa Qiagen siguiendo las instrucciones del proveedor, en este caso *QIAprep Spin Miniprep Kit*, basado en el método de lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979). Este método consiste en lo siguiente:

- Lisis alcalina de las bacterias.
- Precipitación de las proteínas y del genoma bacteriano.
- Purificación del plásmido mediante una resina que provee el mismo *kit*.

##### 4.2.2 Midiprep y Maxiprep.

Los equipos utilizados para la preparación de DNA a gran escala son de nuevo los comercializados por Qiagen. También están basados en la lisis alcalina de las bacterias y en la purificación de los plásmidos mediante cromatografía de intercambio iónico. El protocolo utilizado ha sido el indicado por el proveedor.

#### 4.3 Análisis del DNA por restricción.

La digestión del DNA se ha llevado a cabo siguiendo las instrucciones de los proveedores y utilizando los tampones suministrados con los enzimas. Se recomienda una relación de una unidad enzimática por µg de DNA y una digestión de una hora a la temperatura óptima del enzima. No obstante, por lo general hemos utilizado concentraciones más elevadas de enzima para optimizar la digestión (2-4 U/µg). En ningún caso se ha superado un volumen de enzima superior al del 10% del volumen final de reacción, dado que la solución de enzima suele contener glicerol al 50% como crioprotector, y concentraciones de glicerol superiores al 10% pueden inhibir la reacción enzimática.

#### 4.4 Electroforesis en gel de agarosa.

---

La electroforesis en gel de agarosa es un método estándar para separar fragmentos de DNA. La movilidad de los fragmentos de DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. El factor más importante en la separación de los fragmentos de DNA es la medida del poro del gel, es decir, la concentración de agarosa. Rutinariamente hemos utilizado una concentración del 1% (p/v) de agarosa que nos da una buena resolución en la separación de fragmentos de entre 0,4 a 6 kb. Para resolver fragmentos más pequeños se utilizan concentraciones de hasta el 3% de agarosa.

A) *Soluciones.*

- TAE 50x (Tampón Tris-Acetato-EDTA) (2 M Trizma base; 1 M ácido bórico; 50 mM EDTA). Se conserva a temperatura ambiente.
- Solución de bromuro de etidio 400 µg/ml.
- Tampón de carga 5x (40 mM EDTA; 0,1 % SDS; 30% Ficoll-400; 0,2% azul de bromofenol). Se conserva alicuotado a -20°C.
- Gel de agarosa (1% agarosa; Bromuro etidio 16 ng/ml; TAE 1x). Generalmente se ha preparado justo antes de utilizarlo aunque se puede conservar a 4°C envuelto en papel transparente para evitar su desecación.
- Marcadores de peso molecular (1 kb plus *DNA ladder* de Promega, cat. G571A).

B) *Preparación del gel y las muestras.*

Rutinariamente hemos preparado geles de 50 ml, volumen óptimo para los sistemas de electroforesis utilizados. Las cantidades indicadas se pueden variar según el sistema de electroforesis empleado.

C) *Preparación del Gel.*

1. Pesamos 0,5 g de agarosa y añadimos 50 ml de TAE 1x en un erlenmeyer de 150-200 ml (gel al 1% de agarosa). Marcamos el volumen de la solución.
2. Fundimos la agarosa en un microondas y lo dejamos enfriar a temperatura ambiente. Añadimos agua destilada por compensar las pérdidas por evaporación (hasta la marca anterior).
3. Preparamos el soporte del gel sellando los extremos y colocando el peine (molde para los pozos).
4. Cuando el erlenmeyer se puede tocar sin que queme (aprox. 40°C) se añade el bromuro de etidio. Se mezcla bien y se vierte dentro del soporte sellado y con el peine (molde para los pozos) preparado.
5. Cuando el gel es sólido quitamos el peine y lo colocamos en la cubeta de electroforesis.
6. Cubrimos el gel con tampón TAE 1x.

D) *Preparación de las muestras.*

En un tubo eppendorf de 1,5 ml se añade la muestra de DNA y el volumen correspondiente de tampón de carga 5x (concentración final 1x). Se cargan volúmenes finales de entre 10-25 µl dependiendo del volumen del pozo del gel. La muestra se puede diluir con agua bidestilada caso

---

de estar demasiado concentrada. Se prepara paralelamente un tubo con el marcador de peso molecular.

Se carga cada muestra en un pozo del gel, se conectan los electrodos a la fuente de electroforesis y se corre el gel a un voltaje constante de 70-90 voltios. El DNA, con carga negativa, migra al polo positivo. El resultado de la electroforesis se comprueba en un transiluminador de rayos UV. Disponíamos de un sistema de obtención de imágenes para obtener fotografías de los geles. En los casos en que el DNA se quería recuperar del gel se ha evitado una exposición prolongada a los rayos UV que pudiera producir daños al DNA.

#### 4.5 Recuperación de fragmentos de DNA (de geles de agarosa).

Los fragmentos separados en un gel de agarosa se pueden recuperar para utilizarlos en una ligación, para obtener sondas marcadas o para otras finalidades. Durante la realización de esta tesis se ha utilizado el *kit* comercial de la casa Promega *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (cat. A9282) siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### 4.6 Clonación.

La estrategia que se utiliza de forma más habitual es el clonaje de productos de PCR en vectores comerciales específicos para este cometido y el posterior subclonaje del inserto en otros plásmidos de interés concreto para cada aplicación.

##### 4.6.1 Clonaje de productos de PCR.

La estrategia generalmente empleada para la clonación de productos de PCR aprovecha la actividad transferasa 3' terminal que algunas polimerasas, tal como la Taq, presentan y supone la adición de una desoxiadenosina extra en los extremos 3' de las cadenas amplificadas. Esta característica permite que los vectores comerciales que presentan una desoxitimidina protuberante en sus extremos 3' sean compatibles con los fragmentos de DNA amplificados que se quieren clonar y de esta manera se incrementa notablemente la eficiencia de la posterior ligación.

Los principales pasos a seguir durante los procesos de clonación son los siguientes:

1. Preparación del inserto para clonar y del propio vector que deberá ser clonado.
2. Ligación del inserto en el vector de clonaje.
3. Transformación de los productos de la ligación en bacterias competentes.
4. Análisis de los clones resultantes.

##### A) *Obtención del inserto y el vector de interés.*

El procedimiento puede iniciarse a partir de una reacción de PCR. Los fragmentos de DNA obtenidos deben ser purificados antes de proceder con la ligación. Para ello se prepara un gel de agarosa (mirar **apartado 4.4**) donde se comprueba si se han obtenido bandas del peso molecular esperado. En caso afirmativo, estas son recortadas directamente y se procede con su purificación (mirar **apartado 4.5**).

El siguiente paso corresponde a la digestión tanto del inserto como del vector de clonaje. Es importante que ambos sean procesados con los mismos enzimas para generar extremos idénticos que favorecerán su reconocimiento y unión durante la ligación. En esta tesis, generalmente, se ha trabajado con EcoRI (Promega, cat. R601A) y BamHI (New England Biolabs, cat. R0136S). La digestión se lleva a cabo colocando los eppendorf en el baño a 37 °C durante mínimo 1 hora. A continuación se detalla un ejemplo de digestión del vector pEF utilizando EcoRI y trabajando en un volumen total de 25 µl:

Componente	Cantidad
pEF (0,8 µg)	1,35 µl
EcoRI	1,5 µl
Tampón 10X	2,5 µl
<i>RNA free water</i>	19,65 µl

La purificación del DNA se logra utilizando el mismo *kit* descrito en el **apartado 4.5** y después se procede con la ligación del producto (mirar **apartado 4.7**) y la posterior transformación de las bacterias competentes y recuperación del DNA (mirar **apartado 4.1 y 4.2**, respectivamente).

#### 4.7 Ligación.

La obtención de nuevas construcciones es posible gracias a las técnicas de DNA recombinante. El protocolo de incorporación de fragmentos de DNA en un plásmido (ligación) utilizado en esta tesis ha sido estándar (Sambrook et al. 1989). El protocolo seguido ha sido el mismo para unir fragmentos con extremos romos o cohesivos. Se ha procurado minimizar la exposición del DNA a ligar a los rayos UV, que pueden alterar su estructura y disminuir la eficiencia de la ligación.

##### A) *Reactivos.*

- Ligasa T4 (Promega, cat. M1801) con su tampón de ligación 10X.
- Inserto y vector donde será ligado.

##### B) *Procedimiento.*

1. Se mezclan los fragmentos que se van a ligar procurando mantener una relación molar inserto/vector de 3 a 1 y que la cantidad total de DNA sea de aproximadamente 100 ng. El volumen de la reacción suele ser de 10 µl. Se añade 1 µl de tampón de ligación 10X y 1 µl de T4 ligasa:

Componente	Cantidad
Inserto	7 µl
Vector	1 µl
Tampón 10X	1 µl
T4 DNA ligasa	1 µl

2. Se incuba a 4°C durante 16-18 horas.

3. El producto de ligación se transforma en bacterias competentes y los plásmidos se analizan por restricción. En ligaciones en las que el vector tiene la posibilidad de religarse sin incorporar inserto, se desfosforila previamente a la ligación con fosfatasa alcalina (Roche, cat. 713 023).

#### 4.8 PCR.

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) consiste en la amplificación de un fragmento de DNA a partir de DNA molde. Esta reacción fue desarrollada por Kary Mullis en los años 80. La enzima responsable de esta amplificación es la DNA polimerasa. En esta tesis se ha utilizado la *Taq DNA polymerase* (Invitrogen, cat. 10966-034), que no tiene actividad exonucleasa; y la *Expand High Fidelity Taq polymerase* (Roche, cat. 1732650), que presenta actividad exonucleasa 3'→5' y se utiliza para amplificar fragmentos de cDNA donde es imprescindible una elevada fiabilidad de secuencia. Las cantidades de enzima, tampón, DNA molde, dNTPs y *primers* se debe poner a punto para cada pareja de *primers*.

##### A) Reactivos.

- Enzima Taq polimerasa de Invitrogen (cat. 10966-034) con su tampón 10X.
- Mix dNTPs (Invitrogen, cat. 10297-018) 10 mM.
- *Primers forward* y *reverse* 10 µM correspondientes (ver **Tabla 4.4** del **ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS**).
- *RNA free water*.

##### B) Procedimiento.

1. Preparar la reacción siguiente teniendo en cuenta un volumen final de, por ejemplo, 25 µl:

Componente	Cantidad
DNA	2 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
<i>Forward primer 10 µM</i>	0,5 µl
<i>Reverse primer 10 µM</i>	0,5 µl
Tampón 10X	5 µl
Taq polimerasa	0,2 µl
<i>RNA free water</i>	16,3 µl

2. Se coloca la reacción en el termociclador y se ejecutan las siguientes condiciones de amplificación:

30 ciclos	
Temperatura	Tiempo
94 °C*	5 min
94 °C	40 s
62,5 °C	1 min
72 °C	20 s

72 °C*	3 min
4 °C*	∞

\*Estos tiempos son los generales de inicio y fin de toda reacción de PCR y no entran dentro de los ciclos.

#### 4.9 Mutagénesis dirigida.

El método se basa en la amplificación del DNA por PCR con la *Pfu* DNA polimerasa (Promega, cat. M7745), a partir de dos oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación que se quiere introducir. Una vez finalizada la amplificación, el producto se trata con la enzima de restricción DpnI (Promega, cat. R623A), que sólo corta el DNA que está metilado, de manera que sólo las cadenas sintetizadas *in vitro* serán resistentes a la acción de esta enzima. Después se transforma este DNA en bacterias *E. coli* competentes y se analizan por restricción (si se ha introducido o elimina una diana de restricción con la mutación) o secuenciación los clones obtenidos. En todas las mutaciones realizadas se han seguido las instrucciones del *kit*.

##### A) Reactivos.

- Enzima *Pfu* polimerasa (Promega, cat. M7745) con su tampón 5X.
- Mix dNTPs (Invitrogen, cat. 10297-018) 10 mM.
- *Primers forward* y *reverse* 0.5 µM correspondientes (ver **Tabla 4.4 del ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS**).
- *RNA free water*.

##### B) Procedimiento.

1. Preparar la reacción siguiente teniendo en cuenta un volumen final de, por ejemplo, 50 µl:

Componente	Cantidad
DNA 50 - 100 ng	1 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
<i>Forward primer</i> 0,5 µM	2,5 µl
<i>Reverse primer</i> 0,5 µM	2,5 µl
Tampón 5X	10 µl
<i>Phusion</i> polimerasa	0,5 µl
<i>RNA free water</i>	32,5 µl

2. Se coloca la reacción en el termociclador y se ejecutan las siguientes condiciones de amplificación:

Paso 1 (8 ciclos)		Paso 2 (8 ciclos)		Paso 3 (8 ciclos)	
Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
98 °C*	1 min	98 °C	50 s	98 °C	50 s
98 °C	50 s	68 °C	30 s	64 °C	30 s
72 °C	30 s	72 °C	4,5 min	72 °C	4,5 min

72 °C	4,5 min			72 °C*	5 min
				4 °C*	∞

\*Estos tiempos son los generales de inicio y fin de toda reacción de PCR y no entran dentro de los ciclos.

- Se añade 1 µl del enzima de restricción DpnI a la reacción de PCR y se deja 1 hora a 37 °C.
- Bacterias competentes (JM109 E.coli) son transformadas con 10 µl del producto de la restricción siguiendo los puntos descritos en el **apartado 4.1.1**.

#### C) Precipitación de la muestra.

- A 30 µl de muestra se añade 5 µl de NaCl 5 M y 500 µl de EtOH 100 % frío. Se deja 2 horas a -20 °C.
- Centrifugar a 4 °C y máxima velocidad durante 20 minutos. Eliminar sobrenadante y añadir 500 µl de EtOH 70 % frío. Mezclar bien el contenido.
- Centrifugar a 4 °C y máxima velocidad durante 10 minutos. Eliminar sobrenadante y añadir 10 µl de *RNA free water*. Mezclar.
- Dejar en hielo durante 30 minutos o 1 hora antes de guardar a -20 °C.

#### 4.10 Secuenciación.

La comprobación definitiva de una ligación complicada u otra alteración de la secuencia de DNA, así como la confirmación de una secuencia de nucleótidos, requiere la utilización de un sistema de secuenciación.

Todas las reacciones de secuenciación han sido analizadas por el servicio de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona.

#### A) Reactivos.

- Enzima BD3.1 de Life Technologies (cat. 4337454) con su tampón 5x correspondiente.
- Vector a amplificar teniendo en cuenta que se utiliza 100 ng DNA / 1000 pb.
- Primers* específicos 5 µM.
- RNA free water*.

#### B) Procedimiento.

- Preparar la reacción siguiente teniendo en cuenta un volumen final de, por ejemplo, 20 µl:

Componente	Cantidad
DNA 100 ng	X µl
<i>Primer</i> CMV 5 µM	1 µl
Tampón 5X	3 µl
Enzima BD3.1	1 µl
<i>RNA free water</i>	X µl

- 
2. Se coloca la reacción en el termociclador y se ejecutan las siguientes condiciones de amplificación:

25 ciclos	
Temperatura	Tiempo
96 °C*	5 min
96 °C	10 s
50 °C	5 s
60 °C	4 min
4 °C*	∞

\*Estos tiempos son los generales de inicio y fin de toda reacción de PCR y no entran dentro de los ciclos.

3. El producto obtenido se envía al servicio de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona para que sea analizado.

## 5. Transfección celular transitoria.

El análisis de la funcionalidad de una proteína o bien de la actividad transcripcional de una región promotora de un gen requiere de las técnicas de transfección. En la realización de esta tesis se ha utilizado básicamente el reactivo comercial *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000* de Invitrogen (cat. 11668-027).

### 5.1 Plásmidos utilizados.

Todos los plásmidos empleados en experimentos de transfección fueron purificados mediante la utilización de kits comerciales de la empresa Qiagen para mini-, midi- y maxipreps. Una descripción de los plásmidos utilizados se puede encontrar en la **Tabla 4.3** del **ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS**.

### 5.2 Transfección con el reactivo comercial *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000*.

Este método de transfección comercializado por Invitrogen está basado en una mezcla de lípidos no liposomales que permiten introducir eficientemente DNA exógeno en células eucarióticas. Su ventaja principal es que permite reducir el número de células y la cantidad de DNA necesarios para la transfección y por tanto aumentar el número de puntos experimentales por transfección, además de ofrecer un protocolo experimental de mayor rapidez. Por estos motivos, la mayor parte de las transfecciones transitorias realizadas en esta tesis doctoral se han llevado a cabo utilizando este sistema siguiendo las instrucciones de la casa comercial, la relación  $\mu\text{g DNA} : \mu\text{l Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000}$ , ha sido de 1:2,35.

El porcentaje de células que incorporan el material genético externo en la transfección transitoria es habitualmente muy reducido. En neuronas el porcentaje de transfección, después de la optimización de las condiciones de trabajo, es del 5 %. Por el contrario, las células HEK 293 suele ser superior al 50 %.

#### A) Reactivos.

---

En el caso de las neuronas trabajamos con estos reactivos:

- *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000* de Invitrogen (cat. 11668-027).
- Plásmidos a transfectar.
- Medio TM<sub>ITS</sub>.

Para las células HEK 293, los reactivos son los siguientes:

- *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000* de Invitrogen (cat. 11668-027).
- Plásmidos a transfectar.
- Medio DMEM de BioWhittaker (con 4,5 g/l de glucosa, con glutamina).

#### B) *Procedimiento.*

Todo el procedimiento se desarrolla dentro de la campana de flujo laminar debidamente esterilizada con etanol 70 %.

Las neuronas son transfectadas siguiendo los pasos descritos a continuación:

1. Mínimo 1 hora antes de iniciar el proceso, se añade 1 ml de medio TM<sub>ITS</sub> al cultivo primario de neuronas.
2. Se prepara la Solución A diluyendo las concentraciones estimadas de plásmidos en el volumen adecuado de TM<sub>ITS</sub>. Se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Al mismo tiempo se prepara la Solución B diluyendo la *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000* en el volumen de TM<sub>ITS</sub> adecuado. También se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se combina la mezcla de ambas soluciones preparadas en los dos pasos anteriores y se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Se añade a la mezcla final el volumen de medio TM<sub>ITS</sub> necesario para llegar al volumen final de transfección, el cual se añade al cultivo de neuronas después de retirar su propio medio.
6. Se deja un mínimo de 2,5 horas en el incubador de cultivos a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.
7. Transcurrido el tiempo se retira el volumen de la transfección y se substituye por 1 ml de nuevo medio TM<sub>ITS</sub>. Se deja de nuevo en el incubador durante 48 horas hasta que se procede con los tratamientos pertinentes.

Las células HEK 293 son transfectadas de la siguiente forma:

1. Se prepara la Solución A diluyendo las concentraciones de plásmidos en el volumen adecuado de DMEM. Se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Al mismo tiempo se prepara la Solución B diluyendo la *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000* en el volumen de DMEM adecuado. También se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se combina la mezcla de ambas soluciones preparadas en los dos pasos anteriores y se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Se añade la mezcla de ambas soluciones directamente al cultivo celular sin retirar el medio DMEM que contienen. Dejamos actuar durante 24 horas en el incubador de cultivos a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.
5. Al día siguiente se cambia el medio del cultivo y se substituye por DMEM fresco. Se deja de nuevo 24 horas en el incubador hasta que se procede con los tratamientos pertinentes.

---

## 6. Valoración de proteínas.

La cuantificación de proteínas se ha realizado por el método *BCA Protein Assay* (Pierce, cat. 23225) basado en la reacción de Biuret.

## 7. Western Blot.

El ensayo de *Western Blot* permite la detección de proteínas previamente separadas por SDS-PAGE mediante un anticuerpo específico. Consiste en la transferencia de las proteínas a una membrana sintética, lo cual facilita la manipulación posterior y el acceso de los reactivos a la muestra, la detección de la proteína de interés con un anticuerpo específico y la detección de los complejos anticuerpo-proteína. A continuación se detalla el protocolo utilizado para la electroforesis de proteínas y para la transferencia y detección de las mismas.

### 7.1 Electroforesis SDS-PAGE.

La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida es el método más común de separación de proteínas en función de su tamaño. Consiste en la desnaturalización de las proteínas de la muestra con el detergente SDS, que confiere carga negativa al complejo y se separa en una matriz de poliacrilamida-bisacrilamida aplicando un campo eléctrico.

Se utilizan dos tipos de gel para realizar el SDS-PAGE: un gel de empaquetamiento (*stacking*) y uno de separación (*running*). El gel de empaquetamiento tiene menos porcentaje de acrilamida (3,3%) y por tanto tiene un poro mayor. Este gel cumple la función de alinear las proteínas de la muestra antes de ser separadas. El gel de separación tiene un porcentaje de acrilamida mayor (entre 7,5% y 12%, según el rango de resolución que se quiera obtener) y genera una malla con un poro más pequeño que permite la separación de las proteínas por su peso molecular.

Para identificar los pesos moleculares de las proteínas de la muestra cargamos un carril con marcadores de peso pre-teñidos (mezcla de proteínas de peso conocido que se encuentran formando un complejo con un colorante). Este carril también nos permite monitorizar la electroforesis o la transferencia a membranas (*Western Blot*).

#### A) Soluciones y reactivos.

- Tampón de electroforesis 10x (Trizma base 250 mM; Glicina 1,91 M; 1% SDS).
- Tampón de carga Laemmli 3x (LSB 3x) (4 ml Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8; 12 ml de glicerol 100%; 4 ml de SDS 30%; 1 mg de azul de bromofenol (BPB); se ajusta a 20 ml con H<sub>2</sub>O).
- Tampón LSB 3x con β-mercaptoetanol al 5%.
- Gel de separación (Acrilamida 7,5-12%; Bis-N, -metilen-bis-acrilamida al 0,27%; 0,043% APS; TEMED 2,2 mM).
- Gel de empaquetamiento o *Stacking* (Acrilamida 3,3%; Bis-N, -metilen-bis-acrilamida al 0,088%; 0,1% APS; 0,1% SDS; TEMED 6,6 mM).
- Marcadores de peso molecular preteñidos de Thermo Scientific.

---

B) *Preparación del gel.*

El primer paso es preparar el número de geles necesarios que se van a utilizar con el porcentaje de acrilamida más indicado según las proteínas que se quieran observar. Los volúmenes indicados para cada porcentaje del gel de separación son los siguientes:

<b>Gel Separador (desnaturalizante)</b>							
<b>para 10 ml</b>	<b>5%</b>	<b>7,50%</b>	<b>9%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>13%</b>	<b>15%</b>
Agua destilada	5,45 ml	4,7 ml	4,3 ml	4 ml	3,25 ml	2,9 ml	2,3 ml
TRIS 1,5 M	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Acrilamida 30%	1,7 ml	2,5 ml	3 ml	3,3 ml	4,08 ml	4,5 ml	5 ml
PSA	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl	70 µl
TEMED	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl

En el caso del gel de empaquetamiento o *Stacking* se utilizan los siguientes volúmenes:

<b>Gel Stacking</b>	
<b>para 5 ml</b>	<b>4%</b>
Agua destilada	3,05 ml
TRIS 0,5 M	1,25 ml
SDS 10%	50 µl
Acrilamida 30%	0,65 ml
PSA	60 µl
TEMED	7 µl

C) *Procedimiento.*

Hemos utilizado los sistemas de electroforesis Mini-Protean de BioRad. Estos sistemas permiten el trabajo con volúmenes relativamente pequeños (20-100 µl de carga) y geles fácilmente manipulables.

1. Se añaden entre 15-100 µg de proteína en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Se igualan los volúmenes con agua bidestilada y añadimos el tampón de LSB 3x con β-mercaptoetanol de forma que éste quede diluido 3 veces.
3. Hervimos las muestras a 95 °C durante 5 minutos. No es necesario hacerlo con los marcadores de pesos moleculares. Se ponen en hielo unos minutos para enfriar la mezcla.
4. Centrifugamos a velocidad máxima durante unos segundos. Las muestras están preparadas para cargar.
5. El gel se suele preparar antes que las muestras y generalmente el mismo día en que se utiliza.
6. Cargamos los marcadores de pesos moleculares y las muestras con la pipeta P20.

- 
7. Colocamos la tapa con los electrodos y llevamos a cabo la electroforesis durante aproximadamente 1 h a 125 V. Detenemos el proceso cuando el frente marcado por el BFB llega hasta el final del gel.
  8. Desmontamos el sistema y separamos el gel de los cristales. Procedemos a la transferencia de las proteínas a una membrana de difluoruro de poli-vinilideno (PVDF).

### 7.2 Transferencia de proteínas.

Las proteínas se han transferido a una membrana de PVDF (Inmobilon®-P, Millipore). Este material hidrofóbico es mucho más resistente que la nitrocelulosa.

#### A) Soluciones y Reactivos.

- Tampón de transferencia (pH 8,3) (Trizma-base 25 mM; Glicina 192 mM; Metanol 20%).

#### B) Procedimiento.

1. Tras la electroforesis se descarta el gel de empaquetamiento (*stacking*). El gel de separación se separa y se sumerge en tampón de transferencia.
2. Se corta una membrana de igual medida que el gel, se incuba en metanol durante unos 30-60 segundos, después en agua bidestilada durante 2 minutos hasta que esté completamente hidratada, y finalmente se sumerge en tampón de transferencia. Se cortan 2 rectángulos de papel Whatmann 3MM ligeramente más grandes que el gel.
3. Se prepara un recipiente con tampón de transferencia y se utiliza para montar el sándwich de transferencia. Éste estará compuesto por: una esponja rectangular (suministrada con el sistema), uno de los rectángulos de papel Whatmann, el gel marcado para poder reconocer su orientación, la membrana marcada del mismo modo, el otro papel Whatmann y una segunda esponja. Se procura que no queden burbujas entre el gel y la membrana, que podrían afectar a la transferencia. Cerramos este casete procurando no mover el sándwich.
4. Colocamos el casete en la cubeta de transferencia asegurándonos que la orientación sea la correcta: las proteínas migran del gel hacia la membrana al desplazarse hacia el polo positivo. Introducimos un bloque de hielo (soporte suministrado con el sistema) que evitará un excesivo calentamiento del sistema durante la transferencia. Llenamos la cubeta con tampón de transferencia y aplicamos una corriente constante de 75 V durante 100 minutos.
5. Desmontamos el sistema evitando que la membrana se seque. Las bandas correspondientes al marcador nos dan idea de la eficiencia de la transferencia.
6. Colocamos la membrana en un recipiente con solución de bloqueo (apartado siguiente).

### 7.3 Ensayo de inmunodetección.

Este proceso consiste en: a) bloqueo de la membrana, b) incubación con el anticuerpo primario, c) incubación con anticuerpo secundario conjugado con HRP, y d) detección con el sistema ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) de Biological Industries.

---

El bloqueo de la membrana, que se consigue incubándola con una solución rica en proteínas, previene la unión inespecífica del anticuerpo. El segundo paso permite la detección de la proteína de interés por parte del anticuerpo. El complejo proteína-anticuerpo es reconocido por un anticuerpo secundario que permite su detección por ECL y una amplificación de la señal.

A) *Soluciones y Reactivos.*

- Solución de bloqueo: Leche desnatada al 5% en PBS.
- Solución de anticuerpo primario: Preparados en solución de bloqueo diluida en PBS (1% leche). Para un resumen de todos los anticuerpos empleados, ver la **Tabla 4.1** y **4.2** del **ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS**.
- PBS 1x (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM. Se ajusta el pH a 7,5).
- Tampón de lavado: Tween-20 al 0,2% en PBS 1x.
- Anticuerpos secundarios: Comerciales, producidos en oveja y acoplados a la HRP de Sigma. Dirigidos contra IgG de conejo o ratón.
- Reactivo ECL (Biological Industries, cat. 20-500-120). Se prepara mezclando 2 ml del reactivo 1 con 2 ml del reactivo 2. Se puede conservar preparada durante 24 horas. Es recomendable preparar este reactivo inmediatamente antes de ser utilizado.
- Solución de borrado: Se añaden 4 ml de Re-Blot Plus Strong Solution (10X) de Millipore (cat. 2504) a 36 ml de agua bidestilada.

B) *Procedimiento.*

1. Incubamos la membrana con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
2. Sellamos la membrana dentro de una bolsa de plástico y añadimos 5 ml de solución de anticuerpo primario. Lo incubamos en agitación orbital a 4 °C durante 16-18 horas o 1 h a temperatura ambiente.
3. Recuperamos la solución de anticuerpo y la conservamos. Lavamos la membrana con 100-150 ml de tampón de lavado durante 5 - 10 minutos a temperatura ambiente con agitación.
4. Repetimos el paso anterior dos veces más.
5. Incubamos en 10 ml de la solución de anticuerpo secundario adecuada (dependiendo de la especie en que se ha producido el anticuerpo primario) y lo mantenemos a temperatura ambiente y agitación durante al menos 1 hora.
6. Descartamos la solución de anticuerpo. Lavamos la membrana 3 veces con tampón de lavado a temperatura ambiente y agitación durante 10 minutos cada vez.
7. Incubamos la membrana durante 1 minuto con el reactivo de ECL. La ponemos en una bolsa de plástico para evitar que se seque y exponemos en una película fotográfica de *BioMax Light Film* (Kodak) con la membrana a temperatura ambiente y dentro de la cámara oscura.
8. La membrana se puede reutilizar incubándola con otro anticuerpo (a partir del paso 2) siempre y cuando la señal de la proteína que se quiere detectar no se confunda con la de la proteína previamente detectada. Para ello se incuba la membrana durante 15 minutos en solución de borrado que puede ser reciclado varias veces. A continuación, se hacen dos lavados con solución de bloqueo, previamente al bloqueo de 1 hora propiamente dicho, para eliminar bien los restos de solución de borrado. En nuestro caso, aparte de

---

hacer segundas incubaciones posterior, también cortamos la membrana en dos trozos e incubamos cada parte con el anticuerpo correspondiente. Este corte debe hacerse utilizando los marcadores de pesos moleculares como referencia para saber aproximadamente la altura a la que se encuentran las proteínas que queremos detectar.

9. Los análisis de densitometría se llevaron a cabo con el software *MacBiophotonics ImageJ*.

## 8. Obtención de proteínas mitocondriales (aislamiento mitocondrial) y citoplasmáticas.

No existe un protocolo común para el aislamiento de mitocondrias de tejidos y células. Aunque se sigue el mismo esquema: preparación de un homogenizado seguido de una centrifugación diferencial y, si es necesario, centrifugación por gradiente de densidad. Las características intrínsecas de las células o de los tejidos y la finalidad experimental de las mitocondrias aisladas determinan la selección del homogeneizador, la composición del tampón, los niveles aceptables de contaminantes etc., es por eso, que un buen aislamiento de mitocondrias requiere conocer la naturaleza de las células o el tejido con los que se va a trabajar.

Las soluciones utilizadas, deben mantener la integridad de las mitocondrias, facilitar el fraccionamiento y ser compatibles con procedimientos posteriores. Típicamente, las mitocondrias son aisladas en una solución que contiene un tampón para mantener el pH del homogenizado, un agente quelante y un azúcar para mantener la tonicidad de los orgánulos, casi siempre se utiliza 0,25 M sacarosa; dependiendo de la procedencia de las mitocondrias la composición exacta del tampón cambiará.

La preparación del homogenizado es un paso crítico en el aislamiento de mitocondrias. El objetivo principal es romper y abrir las células sin afectar la integridad de los orgánulos sub-celulares.

### A) *Materiales y reactivos.*

- Tampón de homogenización (0,25 M sacarosa; 1 mM EGTA; 10 mM HEPES-NaOH pH 7,4; Inhibidores de proteasas *Cocktail Set III* de Calbiochem (cat. 539134) 1:200). Este tampón se prepara el mismo día del experimento y se mantiene en hielo durante todo el proceso.
- Placas de células en cultivo.
- *Scraper* de plástico para des-adherir las células de la superficie de la placa o una punta azul de la pipeta P1000 donde se deshace la punta con un mechero para dejarla lisa y plana.
- PBS 1x, pH 7,4.
- Homogeneizador (tipo *tight-fitting glass-Teflon homogenizer*).
- Microcentrífuga Eppendorf (cat. 5424 R) atemperada a 4°C. Tubos eppendorf de 1,5 ml.
- Tampón de carga Laemmli 1.5x (LSB 1.5x) (9 ml Tris-HCl 1 M, pH 6,8; 15 ml de glicerol 100%; 3 g de SDS; 37,5 mg de azul de bromofenol (BPB); 7,5 ml de β-mercaptoethanol; se ajusta a 100 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada).

### B) *Procedimiento.*

- 
1. Se parte de las placas de 6 pocillos donde se han cultivado neuronas y se han realizado las estimulaciones pertinentes.
  2. Se colocan las placas sobre una superficie horizontal en hielo, se aspira el medio de cultivo de las placas y las células se lavan 2 veces en PBS 1x.
  3. Se elimina el PBS y se congelan las placas rápidamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  si la extracción de mitocondrias no se realiza el mismo día.
  4. Se añaden de 250  $\mu\text{l}$  de tampón de homogenización frío con inhibidores de proteasas y se des-adhieren las células de la placa con la ayuda de un *scraper* o las puntas azules de la P1000.
  5. Se recoge la suspensión obtenida en un homogenizador de vidrio en hielo y se homogeniza el lisado de células 60 veces con un émbolo de teflón.
  6. Recogemos el homogenizado en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se separan  $\sim 100$   $\mu\text{l}$  para posteriores análisis, y se centrifuga a 700 g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se guarda el sobrenadante en hielo y se repite la misma etapa de centrifugación a 700 g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los precipitados se descartan porque corresponden a extractos nucleares, membranas rotas y células que no se han roto.
  7. El sobrenadante se recupera y se centrifuga a 14000 g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se descarta.
  8. El precipitado de esta última centrífuga es un punto blanco pequeño que corresponde a las mitocondrias. Se extrae todo el sobrenadante posible y se transfiere a las columnas del *Centrifugal Filter Units* de Millipore (cat. UFC501096) para proceder con el purificado de las proteínas de la fracción citoplasmática. El precipitado, las mitocondrias, son lavadas 2 o 3 veces con 250  $\mu\text{l}$  de tampón de homogeneización para asegurarnos de eliminar cualquier resto de fracción citoplasmática.
  9. Los contenidos finales se resuspenden con 30  $\mu\text{l}$  de tampón de carga Laemmli 1,5x en un eppendorf y se hierven a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.
  10. Para terminar, los eppendorf se pueden congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en un Western Blot (ver **apartado 7**).

## 9. Co-inmunoprecipitación.

Las interacciones proteína-proteína están ampliamente representadas en gran variedad de procesos biológicos como la replicación, la transcripción, la secreción, la transducción de señales y el metabolismo. Por este motivo, se han desarrollado una gran variedad de aproximaciones metodológicas para determinar la interacción entre dos o más proteínas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Para esta tesis, se ha trabajado con la co-inmunoprecipitación, una técnica bioquímica que consiste en la precipitación de complejos proteicos y se fundamenta en el reconocimiento específico de una proteína por parte de un anticuerpo. El anticuerpo lo hacemos interaccionar con unas microesferas magnéticas (proteína A/G) a través de su brazo constante.

### A) Materiales y reactivos.

- Tampón de lisis (0,05 M Tris Base pH 7.6; 0,9 % NaCl; 0,5 % Triton X-100; Inhibidores de proteasas *Cocktail Set III* de Calbiochem (cat. 539134) 1:200; Inhibidor de fosfatasa *Cocktail 2 y 3* de Sigma (cat. 5726 y 0044, respectivamente) 1:200). Este tampón se prepara el mismo día del experimento y se mantiene en hielo durante todo el proceso.

- Microesferas magnéticas de proteína A/G de Thermo Scientific (cat. 88803).
- Placas de células en cultivo.
- *Scraper* de plástico para des-adherir las células de la superficie de la placa o una punta azul de la pipeta P1000 donde se deshace la punta con un mechero para dejarla lisa y plana.
- PBS 1x, pH 7,4.
- Microcentrífuga Eppendorf (cat. 5424 R) atemperada a 4°C. Tubos eppendorf de 1,5 ml.
- Tampón de carga Laemmli 1.5x (LSB 1.5x) (9 ml Tris-HCl 1 M, pH 6,8; 15 ml de glicerol 100%; 3 g de SDS; 37,5 mg de azul de bromofenol (BPB); 7,5 ml de β-mercaptoethanol; se ajusta a 100 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada).

#### B) Procedimiento.

1. Se parte de las placas de 6 pocillos donde se han cultivado neuronas y se han realizado las estimulaciones pertinentes.
2. Se colocan las placas sobre una superficie horizontal en hielo, se aspira el medio de cultivo de las placas y las células se lavan 2 veces en PBS 1x.
3. Se añaden de 400 µl de tampón de lisis frío con los inhibidores de proteasas y fosfatasa y se deja 15 minutos sobre hielo. Después se des-adhieren las células de la placa con la ayuda de un *scraper* o las puntas azules de la P1000.
4. El lisado se clarifica al centrifugarlo a una temperatura de 4 °C a 16000g durante 15 minutos. Se elimina el precipitado.
5. Al sobrenadante se añaden 25 µl de microesferas magnéticas y se deja en un volteador durante 1 hora a 4 °C. Esta etapa sirve para lavar y bloquear proteínas.
6. Se utiliza un imán que permite colocar los eppendorf para poder separar las microesferas magnéticas. El 10 % del sobrenadante se guarda como *input* para poder hacer la normalización.
7. El resto del sobrenadante se incubaba en un volteador durante toda la noche a 4 °C con 2 µg de anticuerpo primario.
8. Al día siguiente, se añaden 30 µl de microesferas magnéticas y se deja en un volteador durante 1 hora a 4 °C.
9. Se vuelve a utilizar un imán que permite colocar los eppendorf para poder separar las microesferas magnéticas. En esta ocasión, las microesferas llevan adherido el anticuerpo primario que incubamos y la proteína de nuestro interés que el anticuerpo haya reconocido.
10. Se elimina el sobrenadante y las microesferas son lavadas 3 veces con tampón de lisis que incluye los inhibidores de proteasas y fosfatasa.
11. Después de los lavados, se añaden 25-30 µl de LSB 1,5x hervido. Este paso permite que el anticuerpo con la proteína de interés unida, se desprege de las microesferas magnéticas. Nuevamente, con el imán separamos las microesferas y el sobrenadante lo recogemos y ponemos a hervir a 95 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.
12. Para terminar, los eppendorf se pueden congelar a -20 °C hasta su utilización en un Western Blot (ver apartado 7).

---

## 10. RT-PCR.

La transcripción inversa-PCR o RT-PCR permite obtener un cDNA de doble cadena partiendo de un mRNA correspondiente. Esta técnica surgió para resolver el problema de la cuantificación de la PCR clásica. Para la RT-PCR se emplean oligonucleótidos marcados con fluorocromos en ambos extremos. Uno de ellos actúa como donador de fluorescencia en el extremo 5' y el otro como aceptor de esta fluorescencia en el extremo 3'. La DNA polimerasa se desplaza sobre la cadena de DNA sintetizando la cadena complementaria a partir de un fragmento de DNA que sirve de molde (cebador). Al llegar al punto en el que la sonda se ha hibridado, la hidroliza. El fluorocromo del extremo 5' de la sonda (el donador) es liberado. El fluorocromo aceptor no puede entonces absorber la fluorescencia del donador por estar alejado de él espacialmente. Un detector realiza la medida de esta emisión de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de DNA presente, y la representa gráficamente. Además de proporcionar información cuantitativa, la PCR en tiempo real presenta otra serie de ventajas frente a la PCR tradicional. Lo fundamental es su mayor sensibilidad, lo que disminuye el riesgo de falsos negativos. El hecho de que los datos sean tomados en la fase exponencial del proceso asegura que ningún componente pueda estar limitando el proceso de amplificación. También es más rápida y tiene menos probabilidad de contaminación con lo que disminuyen los falsos positivos.

### 10.1 Extracción de RNA.

#### A) *Reactivos.*

- *PureLink® RNA Mini Kit* de Life Technologies (cat. 12183018A).
- $\beta$ -mercaptoetanol.

#### B) *Procedimiento.*

1. Cuando las muestras están listas se retira el medio de cultivo y se añade *RNA later*. En esta solución las muestras pueden guardarse durante algunos días a 4 °C.
2. Se añade *Lysis Buffer* más un 1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol a los pocillos para homogenizar el cultivo.
3. Los siguientes pasos vienen definidos por el *kit*.
4. Analizar la concentración ( $\mu$ g) de RNA por  $\mu$ l utilizando el fluorímetro Infinite® M200PRO de TECAN.

### 10.2 Síntesis de cDNA.

#### A) *Reactivos.*

- RNA extraído.
- *Super Script III First Strand Synthesis Super Mix* de Invitrogen (cat. 11752-050).
- *RNA free water*.

#### B) *Procedimiento.*

1. Preparar la reacción siguiente teniendo en cuenta un volumen final de, por ejemplo, 20  $\mu$ l.

Componente	Cantidad
Enzima RT	1,5 µl
Tampón 10X	10 µl
RNA	2 µl
RNA free water	Hasta 20 µl

- Se coloca la reacción en el termociclador y se ejecutan las siguientes condiciones de amplificación:

Temperatura	Tiempo
25 °C	10 min
50 °C	30 min
85 °C	5 min
4 °C	∞

- El producto obtenido se cuantifica en el fluorímetro Infinite® M200PRO de TECAN.

### 10.3 Reacción de RT-qPCR.

#### A) Reactivos y equipo.

- cDNA sintetizado.
- Enzima *GoTaq® qPCR Master Mix* de Promega (cat. A6002) con su tampón 10X.
- Primers forward y reverse* 10 µM correspondientes (ver **Tabla 4.4** del **ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS**).
- RNA free water*.
- Equipo StepOne Real-Time PCR System de Applied Biosystems.

#### B) Procedimiento.

- Preparar la reacción siguiente teniendo en cuenta un volumen final de, por ejemplo, 15 µl:

Componente	Cantidad
cDNA	3 µl
<i>Forward primer 10 µM</i>	0,45 µl
<i>Reverse primer 10 µM</i>	0,45 µl
Syber gree	7 µl
<i>RNA free water</i>	4 µl

- Se coloca la reacción en el equipo de RT-PCR y se ejecutan las siguientes condiciones de amplificación:

40 ciclos	
Temperatura	Tiempo
95 °C*	15 min
95 °C	30 s

60 °C	40 s
72 °C	30 s
95 °C*	15 s
60 °C*	1 min

\*Estos tiempos son los generales de inicio y fin de toda reacción de PCR y no entran dentro de los ciclos.

## 11. Ensayos de fluorimetría.

Esta técnica de espectrofotometría se basa en la absorción de radiación por parte de una molécula fluorescente en una muestra y su posterior emisión de señal. Su fundamento es la fluorescencia que es la emisión de radiación por electrones excitados.

### 11.1 Reactivos, soluciones e instrumentos generales.

- Fluorímetro lector de placas Infinite® M200PRO de TECAN.
- Solución SGG sin *Red Phenol* y medio TM<sub>ITS</sub> (ver apartado de cultivos primarios de neuronas corticales de rata).
- PBS 1x, pH 7,4, enriquecido con Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>+</sup>.

### 11.2 Determinación del Ca<sup>2+</sup> intracelular.

Los iones calcio representan un papel pivote en la fisiología y bioquímica de los organismos y las células. Desempeñan sus funciones en las vías de transducción de señales, donde actúa como segundo mensajero, en la secreción de neurotransmisores por parte de las neuronas, en la contracción de todos los tipos de células musculares y en la fertilización. Su distribución en el organismo no es homogénea y sus concentraciones varían dependiendo de su ubicación. En el interior de las células su concentración ronda los 100 nM y en el espacio extracelular puede encontrarse entre 1 y 2 mM. Por ello es crucial que las células tengan sus múltiples tipos de canales y bombas de calcio para poderlo importar y exportar de la célula pero también entrar y salir de distintos orgánulos como las mitocondrias y el retículo endoplasmático, entre otros. En excitotoxicidad encontramos que el canal NMDA de la membrana plasmática activado por la unión del glutamato se abre permitiendo la entrada de calcio por gradiente al interior de la célula. A raíz de esto, decidimos medir la concentración de calcio intracelular teniendo en cuenta el papel de Mitofusina 2 en el proceso.

Para la detección del calcio existen muchas sondas comerciales. Aquí se ha trabajado con Indo-1 y se ha utilizado debido a sus características ya que se han demostrado sus buenos resultados en gran variedad de tipos celulares y el hecho de poderla emplear a bajas concentraciones sin afectar la calidad de las lecturas.

#### A) Reactivos y soluciones.

- Sonda Indo-1 de Life Technologies (cat. I1223) para medir el calcio. En el fluorímetro se excita a una longitud de onda de 350 nm y emite a 405 y 485 nm. La primera emisión (405 nm) corresponde a la señal del Indo-1 que está unido a calcio mientras que la

---

segunda de ellas (485 nm) hace referencia a la señal que libera la sonda sin calcio unido.

- Ionicina de Sigma (cat. 10634). Se utiliza a una concentración final de entre 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Su acción provoca la entrada masiva de calcio al interior de la célula. Se utiliza como valor máximo de aumento de señal.

#### B) Procedimiento.

1. En primer lugar se disuelve la sonda Indo-1 (50  $\mu\text{g}$ ) en 50  $\mu\text{l}$  de DMSO para obtener una solución de trabajo de 1 g/l (1 mM). Se trabaja a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$ .
2. Las neuronas son mantenidas en medio de cultivo  $\text{TM}_{\text{IRS}}$ .
3. Se procede con lavar la placa con PBS 1x enriquecido con  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{+}$ .
4. A continuación se añade 500  $\mu\text{l}$  de solución SGG sin *Red Phenol* (en caso de trabajar con placas de 24 pocillos) donde se ha añadido la sonda Indo-1 a la concentración de 5  $\mu\text{M}$ . Se tapa con papel de aluminio y se deja en el incubador a 37 °C durante 30 minutos.
5. Transcurrido este tiempo, se realizan 2 lavados con PBS 1x.
6. Se añaden 500  $\mu\text{l}$  de solución SGG sin *Red Phenol* y se vuelve a guardar tapado en el incubador de 37 °C durante 15 minutos para dejar de-esterificar.
7. Por último, se añaden los tratamientos o estímulos pertinentes y se procede a su lectura en el fluorímetro. En general, se ha trabajado haciendo las lecturas por la base de la placa y con un *gain* del 70 %.

#### C) Análisis de los experimentos.

La toma de lecturas se efectúa utilizando el propio *software* que proporciona TECAN. El posterior análisis se realiza utilizando el Excel de Microsoft Office. Aquí es importante restar las lecturas del blanco a los valores obtenidos. La fórmula utilizada para medir la concentración de calcio es dividir el valor obtenido con la emisión de 405 nm (sonda unida a calcio) por la de 485 nm (sonda sin calcio).

#### 11.3 Determinación de los niveles de ATP.

Para la detección de la generación de ATP celular se ha trabajado con un *Kit* específico. Las principales ventajas de este sistema son la alta sensibilidad, excelente linealidad, simplicidad, resultados rápidos y poder trabajar sin tener que recolectar las células. El ATP es un marcador para la viabilidad celular, ya que está presente en todas las células metabólicamente activas y la concentración disminuye muy rápidamente cuando las células sufren necrosis o apoptosis. El sistema de ensayo utilizado se basa en la producción de luz por la reacción del ATP después de añadir luciferasa y D-luciferina. De modo que la señal de luz emitida es proporcional a la concentración de ATP presente en el cultivo. El procedimiento seguido es el descrito en el *Kit*.

#### A) Reactivo y soluciones.

- *ATPlite™ Luminescence Assay System Kit* de PerkinElmer (cat. 6016941).
- Medio  $\text{TM}_0$ .

#### 11.4 Determinación de los niveles de $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .

---

Los niveles de  $\text{NAD}^+$  (forma oxidada) y  $\text{NADH}$  (forma reducida) se midieron por separado teniendo en cuenta la estabilidad y forma de cada coenzima. En el metabolismo de la célula, esta coenzima está implicado en las reacciones de reducción-oxidación moviendo electrones. La forma oxidante recibe electrones de otras moléculas y la capacita para poder actuar como agente reductor y ceder electrones. Se han utilizado buffers distintos para cada uno, ácido y básico, respectivamente. El procedimiento seguido para medir estos parámetros fue el descrito en el *Kit*.

A) *Reactivo y soluciones.*

- $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  *Glo Assay* de Promega (cat. G9071).
- Medio  $\text{TM}_0$ .

## 12. Microscopía de fluorescencia y confocal.

Gran parte de los mayores avances conseguidos en las ciencias biológicas se deben, en parte, a la invención del microscopio óptico cuando a finales del siglo XVII Anton van Leeuwenhoek, un holandés comerciante de telas, tallando lentes, pudo apreciar el mundo que por su tamaño tan pequeño no era posible ver a simple vista: el mundo microscópico. Sin embargo, los intentos de amplificar imágenes se remontan a los griegos y romanos, quienes empleando esferas de vidrio llenas de agua, pretendían observar heridas y tejidos con más detenimiento. Pero la resolución alcanzada no les permitió llegar a atisbar nada que despertara su interés.

Las lentes se utilizaban más de lo que parece. Las primeras aplicaciones de lentes fueron hechas por Euclides, el célebre matemático alejandrino, y Ptolomeo, astrónomo y geógrafo griego, fue inventor del astrolabio, instrumento usado en las observaciones astronómicas. Séneca, quien fuera el tutor de Nerón y su consejero cuando este fue emperador, relata cómo el emperador contemplaba las batallas de gladiadores a través de esmeraldas talladas, posiblemente para corregir así su miopía. A finales del siglo XVI el inventor (entre muchísimas otras dedicaciones) Leonardo da Vinci ya insistía en las ventajas de emplear lentes en el estudio de los objetos pequeños. Aún se debate si la invención del microscopio compuesto de dos lentes fue obra del holandés Zacharias Jansen (1590) o del italiano Galileo Galilei (1609). Ambos diseños eran versiones inversas del telescopio desarrollado por el alemán Hans Lippershey y podían amplificar una imagen hasta diez veces (Charles Van Doren, 1991; Bill Bryson, 2003).

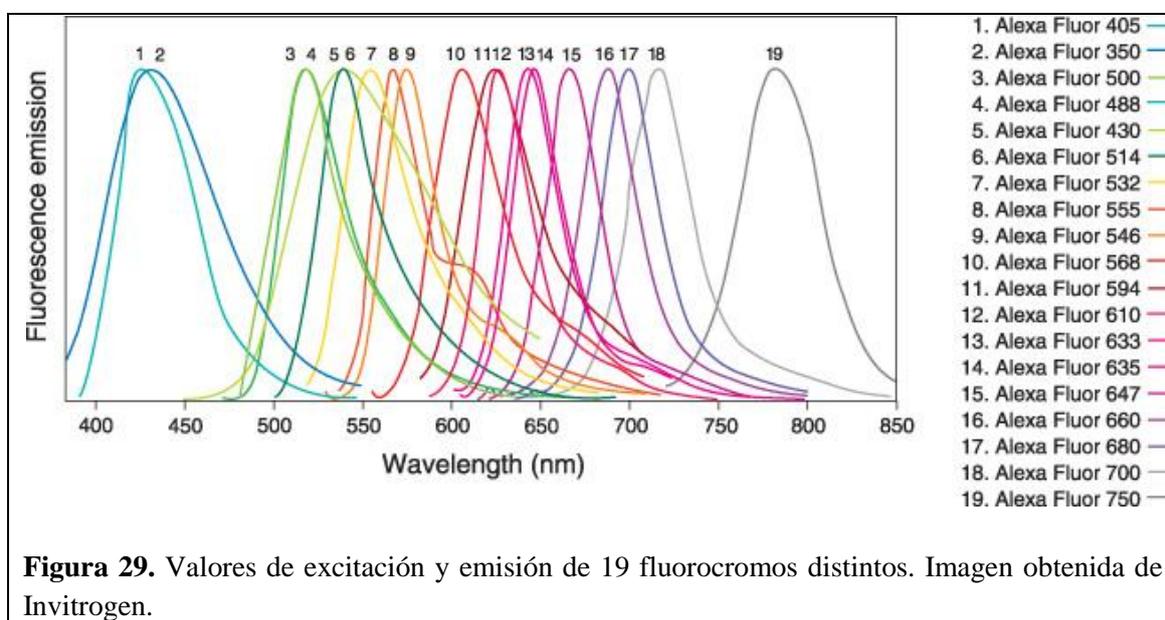
Durante el siglo XVII tuvieron lugar dos momentos trascendentes no solamente en la historia de la microscopía, sino también en la biología celular. La primera ocasión en que se empleó la palabra 'microscopio' en una publicación científica fue hecha en 1625 por los científicos italianos Federico Cesi y Francesco Stelluti en una publicación de la *Accademia dei Lincei*, la más antigua de las sociedades científicas de Europa, en un trabajo titulado *Apiarium*, en el cual reportaban observaciones microscópicas de una abeja. Otra publicación de gran importancia fue *Micrographia*, del filósofo natural inglés Robert Hooke, quien presenta ahí sus observaciones del corcho hechas en 1663 y establece el nombre de 'célula' (Charles Van Doren, 1991; Bill Bryson, 2003).

Años más tarde, el hombre pudo tener evidencia del gran mundo que existía más allá de las lentes y descubrir así un universo inorgánico, como los cristales de la sal de mesa o las sales de oxalato que se encuentran en la orina y cuya acumulación es la causa de los cálculos renales.

Asimismo, se pudieron observar desplazamientos de parásitos intestinales y las amebas, lo que también ayudó a que se quitara la venda del oscurantismo y dar así los primeros pasos en la ciencia moderna. Un hecho más, de entre tantos destacables, fue que gracias al microscopio óptico algunos químicos y médicos, como el francés Louis Pasteur y el alemán Robert Koch, pudieran estudiar las enfermedades que asediaban a la humanidad (Patricia Fara, 2009).

### 12.1 Microscopio de fluorescencia.

Los fluorocromos son compuesto químicos fluorescentes que pueden volver a emitir luz tras ser excitados con una luz de determinada longitud de onda. Cuando son excitados, tienen la propiedad de pasar a un nivel superior de energía, por tanto, una excitación de, por ejemplo, una longitud de onda de 488 nm, tiene su pico de emisión de señal a 519 nm. A medida que las moléculas excitadas regresan a su estado normal liberan el exceso de energía en forma de luz visible de mayor longitud de onda que la radiación excitante (**Figura 29**). Esta propiedad se denomina fluorescencia.



Los microscopios de fluorescencia llevan una fuente luminosa que emite radiaciones ultravioleta, en el límite del espectro visible, que atraviesan el material de la preparación de la misma forma en que lo hace un microscopio óptico común. Las lentes suelen ser de cuarzo ya que el vidrio absorbe la radiación ultra-violeta. A continuación del objetivo llevan unos filtros que retienen la radiación ultra-violeta, que es peligrosa para el ojo humano, dejando pasar solamente la radiación visible, que no es peligrosa.

El microscopio de fluorescencia utilizado es el Olympus BX61/BX62 del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (**Figura 30**).



**Figura 30.** Microscopio de fluorescencia Olympus BX61/BX62 del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

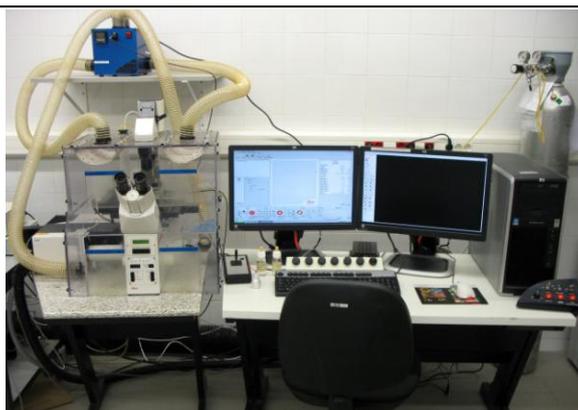
## 12.2 Microscopio confocal.

El funcionamiento del microscopio láser confocal es muy similar al del microscopio de fluorescencia. Su principal ventaja estriba en que permite obtener imágenes de mayor calidad mediante técnicas de filtrado espacial que eliminan la luz que proviene de planos fuera de foco. Esto permite controlar la profundidad de campo y, además, obtener series de imágenes del espécimen cambiando el plano de foco. Se pueden obtener secciones ópticas de 0.16 a 1.5 micras de especímenes fluorescentes de un espesor de aproximadamente 50 micras o más.

El microscopio confocal fue inventado a mediados de 1950 por el científico estadounidense Marvin Lee Minsky con el objetivo de visualizar las redes neuronales y observar los eventos biológicos en sistemas vivos. Debido a problemas en la intensidad de las fuentes de luz y a la escasez de potencia de cálculo de las computadoras de la época, el invento pasó desapercibido por mucho tiempo. El primer instrumento comercial apareció en 1987, y se desarrolló durante los años 90 debido al avance en óptica y en electrónica.

El fundamento del microscopio confocal es, básicamente, el mismo al descrito anteriormente (microscopio de fluorescencia); sin embargo, algunos de los elementos difieren en sus características. En primer lugar, la luz de excitación (procedente de un láser) ilumina áreas muy precisas de la preparación. De este modo, se atenúa el fenómeno de blanqueamiento sufrido por las muestras cuando son excitadas por un largo periodo de tiempo o a una intensidad lumínica muy elevada. En segundo lugar, la luz fluorescente emitida es conducida hacia un diafragma conocido como *pinhole* consistente en un anillo que evita la contaminación lumínica procedente de áreas adyacentes al plano focal.

Durante esta tesis se ha tenido acceso a la Unidad de Microscopía Óptica Avanzada de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona. Las células se han visualizado con un microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SP2 (Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Alemania) adaptado a un microscopio invertido Leitz DMIRBE a 37 °C y en una atmósfera controlada al 5 % de CO<sub>2</sub> (*Life Imaging Services*). Las imágenes han sido adquiridas utilizando un objetivo Leitz Plan-Apochromatic 63X (1,32 NA). En la **Figura 31** se muestra una imagen del microscopio confocal utilizado.



**Figura 31.** Microscopio Confocal Leica TCS SP2 de la Unidad de Microscopía Óptica Avanzada de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona utilizado durante esta tesis.

### 12.3 Fijación de las muestras con paraformaldehido.

Comúnmente suelen utilizarse alcoholes para fijar las muestras. Pero se ha descrito que la preservación de algunos antígenos después de utilizar metanol, no es óptima. El paraformaldehido (PFA), la forma polimerizada del formaldehido, es un compuesto estable cuando se mantiene entre 4 °C y temperatura ambiente pero puede liberar cantidades crecientes de gas formaldehido cuando se disuelve en agua.

Durante la elaboración de esta tesis, todas las muestras que se han querido estudiar mediante la observación o la toma de imágenes en el microscopio de fluorescencia o en el confocal, han sido fijadas previamente con PFA. En el caso de que las muestras quieran ser monitorizadas *in vivo* para observar, por ejemplo, las variaciones del calcio intracelular o el potencial de membrana mitocondrial, estas no deben ser fijadas.

#### A) *Reactivos generales.*

- Paraformaldehido 3 %.
- Sacarosa 4 %.
- PBS 1x (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM. Se ajusta el pH a 7,5).
- Nonidet P40 de Fluka (cat. 74385).
- Medio de montaje con DAPI *Vectashield* de Vector Laboratories (cat. H-1200).

#### B) *Preparación del PFA.*

Volúmenes indicados para 1,5 litros de fijador:

Componente	Cantidad
Paraformaldehido	45 g
Sacarosa	60 g
PBS 10x	150 ml
Agua	Hasta 1,5 l

- 
1. Se pesa el paraformaldehído y se añade en una botella grande junto a la sacarosa, el PBS 10x y el agua hasta llegar a 1,5 litros.
  2. La botella se coloca en un agitador magnético que controle la temperatura y se le añade una mosca (imán) para que vaya removiendo el contenido. Con un termómetro se mide la temperatura para que no exceda de 65 °C. La reacción es larga y el PFA tarda entre 1 y 2 horas en diluirse.
  3. Cuando todos los sólidos se han disuelto, se apaga la temperatura y se deja enfriar hasta los 50 °C manteniendo una agitación constante. Este proceso dura unos 40 minutos.
  4. Se guardan alícuotas congeladas a -20 °C del tamaño deseado.

C) *Procedimiento para fijar las muestras.*

Ejemplo en caso de una placa de 24 pocillos:

1. El cultivo de neuronas es retirado del incubador y, mediante aspiración, eliminamos el medio de cultivo.
2. Inmediatamente se añaden 250 µl de PFA 3 % y la placa es guardada en un lugar oscuro a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3. Se lavan las células dos veces con PBS 1x.
4. El cultivo se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente y oscuridad en PBS 1x con un 0,5 % de Nonidet P40 para permeabilizar las membranas celulares.
5. Se lavan las células dos veces con PBS 1x.
6. A continuación ya puede procederse con, por ejemplo, un marcaje por inmunofluorescencia. Si las placas contenían cubres, estos pueden ser montados en un portaobjetos utilizando medio de montaje.

#### 12.4 Análisis de la morfología mitocondrial.

El estudio de la morfología de las mitocondrias se ha realizado mediante ambos tipos de microscopios, fluorescencia y confocal. El primero de ellos se ha empleado más para las múltiples medidas que se han tomado a lo largo de la tesis sobre el porcentaje de neuronas con mitocondrias en estado fusionado, fisionado y muertas. Las neuronas son transfectadas con distintos plásmidos (ver **Tabla 4.3** del **ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS**). Dos de ellos han sido utilizados en prácticamente todos los casos. Son los que nos permiten marcar las mitocondrias con GFP o RFP según interese. Tras la transfección los cultivos se dejan 48 horas en el incubador a 37 °C de temperatura y 5 % de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se llevan a cabo los tratamientos pertinentes (ver lista de inhibidores comerciales utilizados en la **Tabla 4.5** del **ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS**) y las neuronas son fijadas con PFA 3 %. Tras montar los cubreobjetos en los portaobjetos utilizando el medio de montaje con DAPI, se analiza la morfología de las mitocondrias que ha podido estar afectada por el tratamiento y los demás plásmidos utilizados.

Al microscopio confocal se ha acudido para la obtención de fotografías consiguiendo, de este modo, una mayor resolución de las muestras.

#### 12.5 Marcaje por inmunofluorescencia.

Muchos progresos conseguidos en biología molecular son gracias a los avances realizados en las técnicas basadas en las reacciones inmunológicas. Los más útiles y prácticos de ellos son

---

aquellos que se basan en la especificidad de la unión de un anticuerpo (Ac) con su antígeno (Ag). La propiedad innata de las inmunoglobulinas (Ig) de unirse a un Ag, la especificidad de esta unión y el hecho de que pueda ser visualizada por distintos mecanismos, hacen que estos métodos se empleen ampliamente.

Hay varios métodos genéricos muy utilizados que se basan en este principio. Cabría destacar los siguientes:

- Técnicas de aglutinación: Cuando el antígeno se encuentra unido o formando parte de células, bacterias o partículas, la reacción Ag-Ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado celular o bacteriano formado.
- Técnicas de fluorescencia y citometría de flujo: Para la realización de estas técnicas el anticuerpo se marca con un fluorocromo detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida.
- Técnicas de radioinmunoensayo: En estas técnicas al anticuerpo se une un isótopo radiactivo siendo posible la cuantificación del complejo Ag-Ac a través de la radiactividad emitida.
- Cromatografía de afinidad: La especificidad de la unión Ag-Ac puede utilizarse para obtener Acs y Acs puros.
- Inmunoprecipitación e *immunoblotting*: Permite detectar la presencia y cantidad de antígenos y anticuerpos específicos.

En este apartado se procede a detallar el marcaje realizado con fluorescencia para analizar las muestras con el microscopio de fluorescencia. El concepto fundamental de esta técnica reside en la propiedad de ciertas moléculas que, al ser irradiadas con energía electromagnética de longitud de onda adecuada, emiten radiación de longitud de onda característica permitiendo su cuantificación. Las moléculas de un colorante fluorescente absorben luz en una longitud de onda y convierten la luz absorbida de alta energía (longitud de onda más corta) en luz de menor energía (longitud de onda más larga). Cada fluorocromo tiene un espectro de emisión y excitación característico; si se utilizan dos con el mismo espectro de excitación pero distinto espectro de emisión, se pueden medir dos características al mismo tiempo (fluorescencia de dos colores).

#### A) Soluciones y reactivos generales.

Para ver el listado de anticuerpos primarios y secundarios ver la **Tabla 4.1 y 4.2** del **ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS**.

- Solución de bloqueo: *Bovine Serum Albumin* (BSA) al 3 % en PBS 1x.
- Solución de anticuerpo primario: Preparados en solución de bloqueo diluida en PBS 1x.
- PBS 1x (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM. Se ajusta el pH a 7,5).
- Tampón de lavado: Tween-20 al 0,2% en PBS 1x.
- Anticuerpos secundarios: Comerciales, producidos en oveja y acoplados a la HRP de Sigma. Dirigidos contra IgG de conejo o ratón. También se han utilizado anticuerpos secundarios unidos a biotina de Jackson ImmunoResearch que reconocen ratón (cat. 715-065-150) y conejo (cat. 711-065-152).
- Streptavidina de Jackson ImmunoResearch (cat. 016-160-084).
- Medio de montaje con DAPI *Vectashield* de Vector Laboratories (cat. H-1200).

---

B) *Procedimiento en cultivos primarios de neuronas y células HEK 293.*

El protocolo se inicia después de fijar las muestras con paraformaldehído. Ejemplo para una placa de 24 pocillos donde se han añadido cubreobjetos para que las células crezcan encima:

1. Después del último lavado con PBS 1x se añaden 250 µl por pocillo de solución de bloqueo durante 1 hora y se deja en agitación a temperatura ambiente.
2. Se retira el bloqueo y se añaden 250 µl de solución de anticuerpo primario debidamente diluido en PBS 1x. Se deja o/n en agitación a 4 °C.
3. A la mañana siguiente se recupera el anticuerpo primario y se guarda a -20 °C. Se procede con tres lavados del cultivo con PBS 1x en agitación a temperatura ambiente.
4. A continuación, incubamos en 250 µl de la solución de anticuerpo secundario adecuada (dependiendo de la especie en que se ha producido el anticuerpo primario) y lo mantenemos a temperatura ambiente y agitación durante al menos 1 hora.
5. Descartamos el anticuerpo y realizamos 3 lavados con PBS 1x.
6. Todo ya está listo para ser montado en un portaobjetos utilizando medio de montaje. En el caso de haber utilizado un anticuerpo secundario unido a biotina, se procede con una tercera incubación con Streptavidina.

12.6 Determinación de la muerte celular.

Para evaluar el grado de supervivencia de un cultivo las células se han hecho crecer encima de cubreobjetos colocados en una placa de 24 pocillos. Las muestras han sido transfectadas con los plásmidos de interés y, después de fijarlas con paraformaldehído, se han montado utilizando el medio con DAPI *Vectashield* de Vector Laboratories (cat. H-1200). Las fotografías de los núcleos de las células se han tomado con el microscopio de fluorescencia y han sido analizadas con el *plugin 'Cell counter'* del *software* Image J.

12.7 Determinación del Ca<sup>2+</sup> citoplasmático y mitocondrial por microscopía confocal.

Del mismo modo que utilizando el fluorímetro, se ha determinado la concentración de calcio citoplasmático, además del mitocondrial, por microscopía confocal. El procedimiento seguido ha sido exactamente el mismo que se ha especificado en el **apartado 11**. Para la detección del calcio citoplasmático se ha trabajado con la sonda Fluo-4 y para el calcio mitocondrial se ha utilizado la sonda Rhod-2 y también se ha probado de transfectar las neuronas con el plásmido GCaMP2-mt unido a GFP (ver **Tabla 4.3** del **ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS**).

A) *Reactivos e instrumentos específicos distintos a los utilizados en el análisis por fluorimetría.*

- Confocal Leica TCS SP2.
- Sonda Fluo-4 de Invitrogen (cat. F-14201) para medir el calcio citoplasmático. Se excita a una longitud de onda de 488 nm. Es una sonda que permite obtener un resultado no ratiométrico.
- Sonda Rhod-2 de Invitrogen (cat. R-1245MP) para medir el calcio mitocondrial. Se excita a una longitud de onda de 550 nm. También permite obtener un resultado no ratiométrico.
- Placas de plástico de 35 mm de diámetro con un cubre de vidrio incorporado en el centro de MatTek Corporation (cat. P35G-1.5-14-C).

---

## 12.8 Medida del potencial de membrana mitocondrial.

A lo largo de la cadena transportadora de electrones se genera energía que se utiliza para bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, creando así un gradiente de protones ( $H^+$ ) llamado potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). La función del gradiente es permitir la generación de ATP por la acción de la enzima ATPsintasa. Esta acción permite separar dos compartimentos con diferente concentración de  $H^+$ , lo que genera diferencias a nivel químico y a nivel de la distribución de la carga a través de la membrana. La pérdida de la distribución asimétrica de protones en ambas caras de la membrana mitocondrial interna, trae consigo la disipación del gradiente eléctrico y químico. A nivel de la cadena de transporte de electrones ocurre un desacople con una consiguiente caída en la producción de ATP y la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno o ROS. La respiración se puede ver interrumpida y se produce la masiva liberación de iones de calcio a la matriz.

### A) Reactivos generales.

- Confocal Leica TCS SP2.
- Sonda *Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate* (TMRM) de Sigma (cat. T5428).
- *Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone* (CCCP) de Sigma (cat. C2759). El CCCP provoca el desacoplamiento total del potencial de membrana mitocondrial. Se utiliza como valor máximo de caída. Su concentración de trabajo es de 10  $\mu M$ .
- Solución SGG sin *Red Phenol* y medio  $TM_{ITS}$  (ver apartado de cultivos primarios de neuronas corticales de rata).
- PBS 1x, pH 7,4, enriquecido con  $Ca^{2+}/Mg^+$ .
- Placas de plástico de 35 mm de diámetro con un cubre de vidrio incorporado en el centro de MatTek Corporation (cat. P35G-1.5-14-C).

### B) Procedimiento.

1. El cultivo primario, que se encuentra en medio  $TM_{ITS}$ , es lavado con PBS 1x enriquecido con  $Ca^{2+}/Mg^+$ .
2. Se añaden 1,5 ml de solución SGG sin *Red Phenol* a la placa de 35 mm de diámetro con TMRM a una concentración final de 20 nM.
3. Se deja actuar durante 45 minutos tapado con papel de aluminio en el incubador de 37 °C.
4. Transcurrido este tiempo se pueden empezar directamente las lecturas. En el confocal se ha trabajado con una excitación de 540 nm y una emisión de 570 nm.

## 12.9 Análisis de la colocalización entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias.

Las neuronas corticales fueron transfectadas por un lado con Globina (control) o Mfn2 y Shsc (control) o ShMfn2, por el otro. Además, fueron co-transfectadas con el marcador rojo para mitocondrias mitoRFP y el marcador verde GFP-Sec61 $\beta$  para el retículo endoplasmático. La colocalización se analizó con el coeficiente de Mander's del *plugin* JACoP del software ImageJ y, también, con el *plugin* RGB *Profiler* que analiza la intensidad relativa de la fluorescencia de cada fluorocromo de la imagen en cada punto (ver **apartado 15.6** para una explicación con más detalle).

---

A) *Reactivos y aparatos generales.*

- Confocal Leica TCS SP2.
- Solución SGG sin *Red Phenol* y medio TM<sub>ITS</sub> (ver apartado de cultivos primarios de neuronas corticales de rata).
- PBS 1x, pH 7,4, enriquecido con Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>+</sup>.
- Placas de plástico de 35 mm de diámetro con un cubre de vidrio incorporado en el centro de MatTek Corporation (cat. P35G-1.5-14-C).

### 13. Infección con adenovirus.

En esta tesis se ha trabajado con adenovirus creados por el Dr. Francesc X. Soriano. Todos los procedimientos explicados a continuación, fueron elaborados por él.

El trabajo con los adenovirus se ha realizado en una campana de flujo laminar exclusiva para el trabajo con adenovirus. Se han seguido las siguientes precauciones: se trabaja siempre con guantes, bata y mascarilla, las soluciones con adenovirus, una vez utilizadas, se inactivan con lejía y el material (puntas, placas, pipetas,...) se guardan en bolsas que serán tratadas como residuos con riesgo de contaminación biológica.

#### 13.1 Amplificación de adenovirus.

A) *Soluciones y reactivos.*

- Medio DMEM al 2% de suero.
- Medio DMEM al 10% suero.
- Adenovirus.

B) *Procedimiento.*

1. Se parte de 5 placas de 15 cm de Ø de células 293 con una confluencia de aproximadamente el 80%.
2. Se saca el medio al 10% de suero.
3. Se añade 5 ml DMEM al 2% por medio al 2% de suero.
4. Se añaden los adenovirus con aproximadamente 1-2 partículas víricas por célula (MOI 1-2).
5. Se deja al incubador durante 1,5 horas, preferiblemente en ligera agitación.
6. Se sube el volumen a 25 ml con DEMEM al 10%.
7. Al cabo de 36-48 horas se debe producir el efecto citopático. En tal caso los adenovirus están listos para ser recogidos. Si el efecto citopático se produce antes de 24 horas se debe, posiblemente, a un efecto tóxico de las proteínas virales y no a la amplificación de los adenovirus.

#### 13.2 Purificación de adenovirus.

La purificación de los adenovirus se ha realizado utilizando el *BD Adeno-X<sup>TM</sup> Virus Purification Kit* (BD Biosciences, cat. 631533) siguiendo las instrucciones del fabricante. Básicamente

---

consiste en pasar el medio por un filtro que retiene a los adenovirus, recoger las células y lisarlas mediante tres ciclos de congelación-descongelación y pasar el sobrenadante del lisado por el filtro. Finalmente tras unos lavados del filtro con el tampón de lavado suministrado por el fabricante, se eluyen los virus en un volumen pequeño (2-4 ml). La ventaja que ofrece el *kit* respecto al método manual es que en este último la recolección de células se debía hacer al inicio del efecto citopático antes de la lisis celular, pero con el *kit* esto no es limitante pues el filtro es capaz de retener las partículas víricas del medio. Dado que en el *kit* se pueden recolectar los virus una vez finalizado el efecto citopático se parte de un número menor de placas (5 contra 30 del método manual).

### 13.3 Titulación de virus: método del ensayo de formación de calvas.

El problema de la detección de DNA viral por la densidad óptica (DO) a 260 nm (1 unidad de absorbancia equivale a  $10^{12}$  pfu/ml) es que en esta determinación no se discrimina entre DNA vírico no infectivo y DNA vírico infectivo, por lo que a la hora de infectar se puede sobrevalorar enormemente la concentración vírica. Para la titulación del virus uno de los métodos más sensibles y sencillos es el ensayo de formación de calvas.

#### A) *Soluciones y reactivos.*

- *Stock* de adenovirus.
- Medio DMEM.
- Medio DMEM completo.
- Fungizona.
- Extracto de levadura.

#### B) *Procedimiento.*

1. Se parte de 20-24 placas de 60 mm de diámetro de células 293 al 90-95% de confluencia.
2. Se prepara diluciones seriadas de la solución viral a titular. Si por DO a 260 nm un *stock* determinado es de  $10^{10}$  pfu/ml, las diluciones serán de  $10^{-7}$  a  $10^{-13}$  en 1 ml de medio de cultivo sin suero.
3. Con cada dilución, por triplicado, se infectan las células 293 de 1 hora a 37 °C.
4. Se retira la solución viral y la placa se cubre con 8 ml de la mezcla 1:1 de medio DMEM 2X (suplementado con un 10% de suero, 1% fungizona y 1% de extracto de levadura) y la solución de agar noble 1% que se halla a 56 °C. Cada 3-4 días se realiza un cambio del medio de las placas añadiendo 5 ml de la misma mezcla de medio y agar.

Transcurridos 10-12 días, las calvas ya son evidentes. A pocos aumentos se visualizan como áreas más densas y ligeramente blanquecinas en la superficie de la monocapa celular. Si la estimación por DO ha sido correcta se esperaría para la dilución  $10^{-7}$ , 1000 calvas. En la cuenta de las calvas se utiliza sólo las placas que contienen entre 30 y 300 calvas (las que tienen más o menos dan lugar a medidas que no son muy exactas). El título viral será la suma de las calvas de cada placa por su dilución dividido por el número de placas contadas.

### 13.4 Protocolo de infección.

---

A) *Soluciones y reactivos.*

- Medio DMEM.
- Medio DMEM completo de proliferación (10 % de FBS).
- Adenovirus.

B) *Procedimiento.*

1. Las células HEK 293 se crecen en placa de 10 cm o *multiwell* de 6.
2. Se infectan cuando el cultivo se halla en una confluencia del 30%.
3. Las células se incuban durante 1-2 horas en un volumen bajo de DMEM sin suero con un número de unidades infectivas de 100 para las HEK 293.
4. Pasadas las 1-2 horas se aumenta el volumen de medio con suero y se devuelven las placas al incubador hasta el momento en que se utilizan para los distintos protocolos.

#### **14. Ensayos de Hipoxia/OGD (*Oxygen-Glucose Deprivation*).**

Los ensayos de Hipoxia se han aplicado también en cultivos primarios de neuronas corticales de rata para simular un segundo entorno *in vitro* que genera excitotoxicidad. En estos experimentos no se trabaja con la droga antagonista NMDA del receptor de NMDA. En lugar de ello se utiliza una cámara hermética donde se depositan las placas que se van a someter a hipoxia. El ambiente sin oxígeno se consigue sustituyendo el aire del interior de la cámara inyectando gas al 5% CO<sub>2</sub> y 95% de Nitrógeno. El medio en el que se cultivan las neuronas no contiene ningún tipo de azúcar.

A) *Soluciones y aparatos utilizados.*

- Cámara de Hipoxia de Stemcell Technologies (cat. 27310).
- Regulador de volumen de gas para la cámara de Hipoxia de Stemcell Technologies (cat. 27311).
- Bombona de gas X10A-10 L de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de N<sub>2</sub> de Carburos Metálicos (cat. 293009). La bombona incluye un regulador específico para esta combinación de gases también de Carburos Metálicos (cat. 151223).
- Solución SGG Hipoxia: NaCl 5M, MgCl<sub>2</sub> 2M, CaCl<sub>2</sub> 1M, KCl 3M, Glycina 1M, NaHCO<sub>3</sub> 7,5% de Sigma (cat. S8761-500 ml), Hepes 1M de Sigma (cat. H0887-100 ml), Piruvato sódico 0,1M de Sigma (cat. S8636) y Phenol Red 0,5% de Sigma (cat. P0290-100 ml).
- Solución SGG (descrita en el **apartado 2.2**).
- Medio TM<sub>0</sub>.

B) *Procedimiento.*

1. Se trabaja con placas de 24-*well* con cubres para facilitar la recogida de muestras.
2. Dejar las placas con las que se quiere trabajar, incluyendo las placas controles (normoxia), en medio TM<sub>0</sub> o/n o mínimo 2 horas antes de iniciar la hipoxia.

- 
3. Gasear con N-CO<sub>2</sub> 25 mL de agua Mili-Q bidestilada y el volumen de SGG Hipoxia necesario para el experimento durante 3 minutos. Al terminar sellarlo con *Parafilm* y taparlo.
  4. Calentar la solución SGG y la SGG Hipoxia a 37° C.
  5. Añadir solución SGG a las placas control y SGG Hipoxia a las placas que van a ser utilizadas para el experimento con un lavado previo hecho con la misma solución.
  6. Colocar las placas que van a ser sometidas a OGD dentro de la cámara de Hipoxia y sellarla bien. En la bombona de gas se adjunta una goma cilíndrica alargada en la salida del regulador de gas y se conecta al regular de volumen de gas para la cámara. Se gasea la cámara de Hipoxia durante 5 minutos calculando un volumen de 20 L/min de gas mediante el regulador de Stemcell Technologies.
  7. Una vez transcurridos los 5 minutos, se cierra la bombona de gas y se sellan las dos salidas de la cámara de Hipoxia con las pinzas que incorpora.
  8. La cámara se coloca durante 1 hora dentro del incubador a 37° C.
  9. Al retirarse del incubador, se recogen los cubres de los controles de 0 horas y también los de la hipoxia. En los demás pocillos se retira la solución SGG pertinente y se añade medio TM<sub>0</sub>.
  10. Se deja transcurrir el tiempo deseado y se van recogiendo cubres para analizar el mRNA (con *RNA later*) o los valores de proteína con tampón de carga Laemmli 1.5x (LSB 1.5x) (9 ml Tris-HCl 1 M, pH 6,8; 15 ml de glicerol 100%; 3 g de SDS; 37,5 mg de azul de bromofenol (BPB); 7,5 ml de β-mercaptoethanol; se ajusta a 100 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada).

## 15. Medida del consumo de oxígeno.

Estos ensayos fueron descritos a continuación fueron elaborados a partir de nuestros cultivos primarios de neuronas por el Dr. Juan Pablo Muñoz del laboratorio del Dr. Antonio Zorzano en el Instituto de Investigación Biomédica (IRB) del Parque Científico de Barcelona (PCB).

Las neuronas corticales fueron cultivadas en placas Seahorse Bioscience XF24 e infectadas con AAV que producían un shRNA control (Shsc) o un shRNA contra Mfn2 (ShMfn2). Se trabajó con el aparato Seahorse Bioscience XF24 para medir el consumo de oxígeno por estas células. El instrumento era calibrado el día anterior de cada experimento siguiendo las instrucciones de los fabricantes. En el día del experimento, se inyectó Oligomicina (1,25 μM), un inhibidor del complejo V de la cadena respiratoria, para diferenciar el porcentaje de oxígeno consumido utilizado para la síntesis de ATP y el porcentaje de consumo de oxígeno necesario para superar la expulsión natural de protones a través de la membrana interna de las mitocondrias. Se utilizó FCCP (3 μM) para calcular la capacidad respiratoria de las células, Rotenona (1 μM) para inhibir el complejo I de la cadena respiratoria y Antimicina A (1 μM) para inhibir el complejo III para calcular el consumo de oxígeno residual de la respiración (rox). Durante la calibración del sensor, las neuronas fueron mantenidas en el incubador a 37 °C sin CO<sub>2</sub> en 700 μl de medio de fluido cerebroespinal artificial (aCSF) constituido de 120 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM glucosa, 1 mM pirubato y 4 mg/ml de suero bobino sin ácidos grasos pH 7,2. Las placas fueron introducidas rápidamente en la Seahorse XF24 calibrada para analizar las capacidades bioenergéticas de las mitocondrias. El OCR fue normalizado para el total de proteínas/pocillo y calculado como OCR-OCR<sub>rox</sub> para

---

substraer la respiración no vinculada a las mitocondrias. La capacidad respiratoria fue calculada como  $OCR_{FCCP}/OCR_{rutine}$ . El ratio de control respiratorio fue calculado como  $OCR_{FCCP}/OCR_{oli}$ .

## 16. Análisis e interpretación de imágenes.

Todas las imágenes y densitometrías de esta tesis fueron analizadas utilizando el *software* ImageJ (Rasband, WS, 1997-2012). El programa Fiji (una segunda versión del ImageJ) también se ha utilizado indistintamente para analizar resultados ya que permite abrir mucha más variedad de archivos que el ImageJ. Muchos de los *plugins* necesarios han sido descargados de forma gratuita de la propia web del programa (<http://imagej.nih.gov/ij/plugins/index.html>).

### 16.1 Instrucciones básicas del ImageJ.

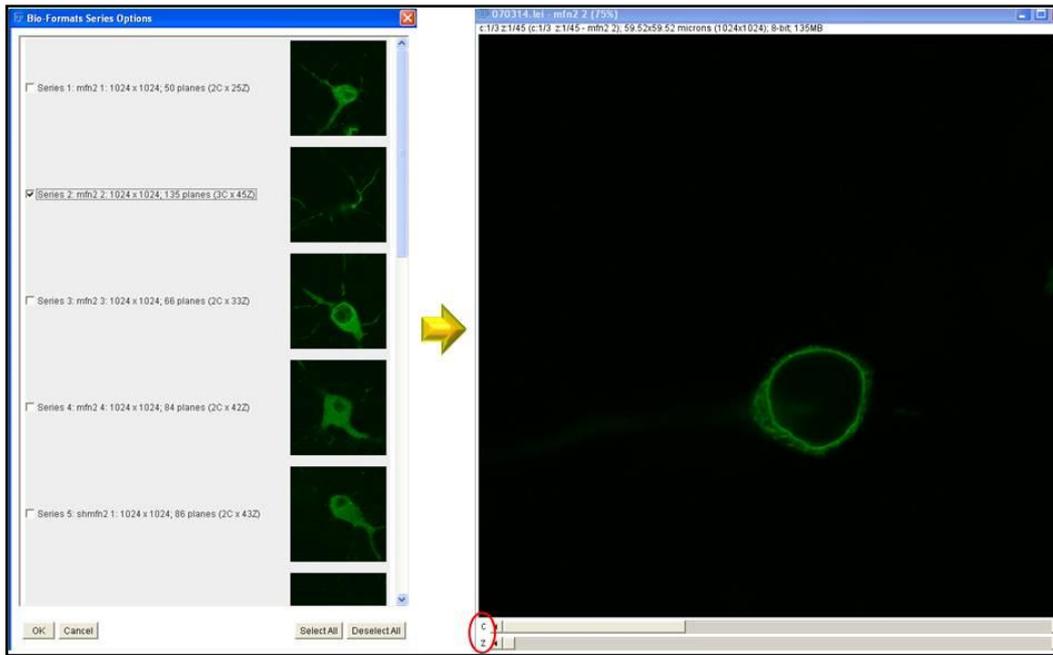
1. Duplicar imagen: *Image – Duplicate*.
2. Ajustar niveles: *Image – Adjust – Brighness/Contrast* o *Color balance*.
3. Filtrar imagen: *Process – Filters – Median*.
4. Cambiar nombre imagen: *Image – Rename*.
5. Seleccionar ROIs y guardarlos: *Analyze – Tools – ROI Manager – Save*.
6. Cambiar color imagen: *Image – Lookup Tables*.
7. Recortar imagen: Definir área con un ROI e *Image – Crop*.
8. Juntar 2 o más series de tiempo: *Plugins – Stacks-Building – Concatenate*.
9. Añadir el tiempo en un *Stack*: *Image – Type – RGB color*. Después definir un ROI cuadrado donde se quiera añadir el tiempo y hacer *Plugins – Movies – Time Stamper*.
10. Añadir texto en un *Stack*: *Image – Type – RGB color*. Después definir un ROI cuadrado donde se quiera añadir el texto y hacer *Plugins – Movies – Event Stamper*.
11. Añadir barra de escala: *Analyse – Tools – Scale Bar*.

### 16.2 Generación y manipulación de *Stacks*.

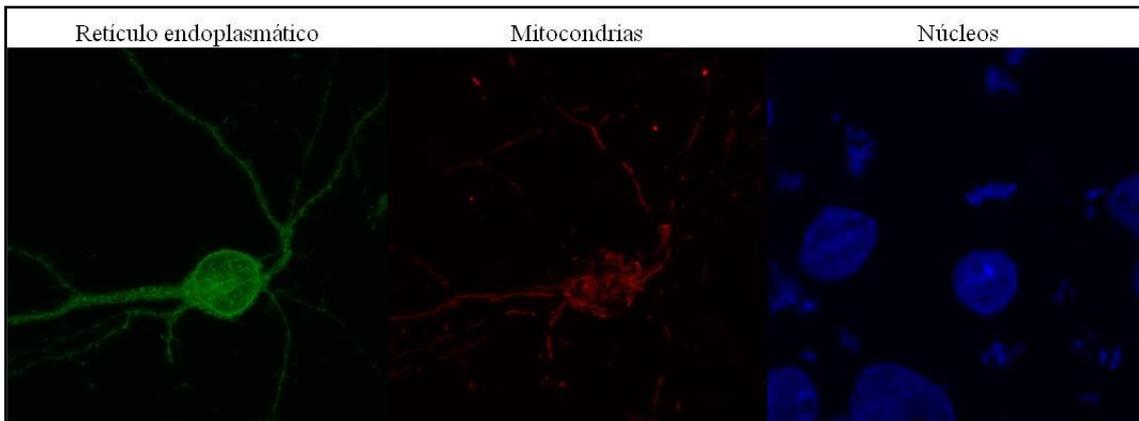
Un *Stack* es un mismo cuadro donde se muestran todas las imágenes que se hayan generado en un experimento. Este cuadro siempre tiene un botón de *Play* para activar la “película”, es decir, para ver todas las imágenes tomadas una por una.

Cuando se realiza un experimento de captura de imágenes a lo largo del tiempo en, por ejemplo, un cultivo sometido a un cierto tratamiento, el microscopio confocal nos proporciona, además de la tira de imágenes, un archivo en formato LEI. Este tipo de archivos pueden abrirse directamente en el Fiji:

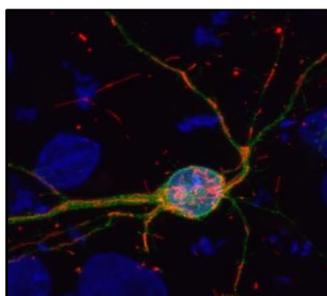
1. Al hacerlo, se abre un cuadro donde se separa cada experimento individual. Seleccionamos el que nos interese y apretamos Ok. El cuadro resultante nos muestra los canales que se hayan utilizado (letra c), por ejemplo, verde, rojo y ultravioleta. Así como también el plano z, es decir las imágenes tomadas a lo largo del tiempo.



2. Para separar los tres canales en tres *Stacks* diferentes: *Image – Color – Split Channels*.
3. Si queremos ver una proyección de los tres canales hacemos con cada uno de ellos: *Image – Stacks – Z Project*.



4. Para fusionar los canales: *Image – Color – Merge Channels*. Se abre un cuadro donde debemos seleccionar qué imagen corresponde a qué color y apretar Ok. En la imagen resultante podemos aplicar modificaciones de brillo/contracte (*Image – Adjust – Brightness/Contrast*) o modificar la intensidad de cada canal de forma individual (*Image – Adjust – Color Balance*).

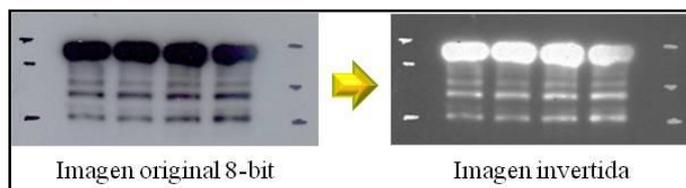


---

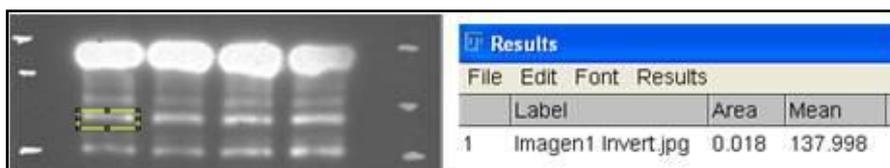
### 16.3 Densitometría.

Todos los films resultantes de los Western Blot fueron escaneados y guardados en formato TIFF. Las imágenes se abrieron en el programa ImageJ. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Modificar la imagen desde su formato original a 8-bits: *Image – Type – 8-bit*.
2. Invertir el grado de grises: *Edit – Invert*.



3. Medir el grado de intensidad de señal de las bandas de interés y apretar la tecla M o hacer *Analyse - Measure*. Esto abrirá un recuadro donde se anotará la intensidad (*Mean*) de la región seleccionada. El mismo recuadro, sin cambiar su tamaño, se mueve a las bandas siguientes y se repite el mismo procedimiento. También se debe colocar el mismo cuadro al lado, encima o debajo del conjunto de bandas para obtener el valor blanco.

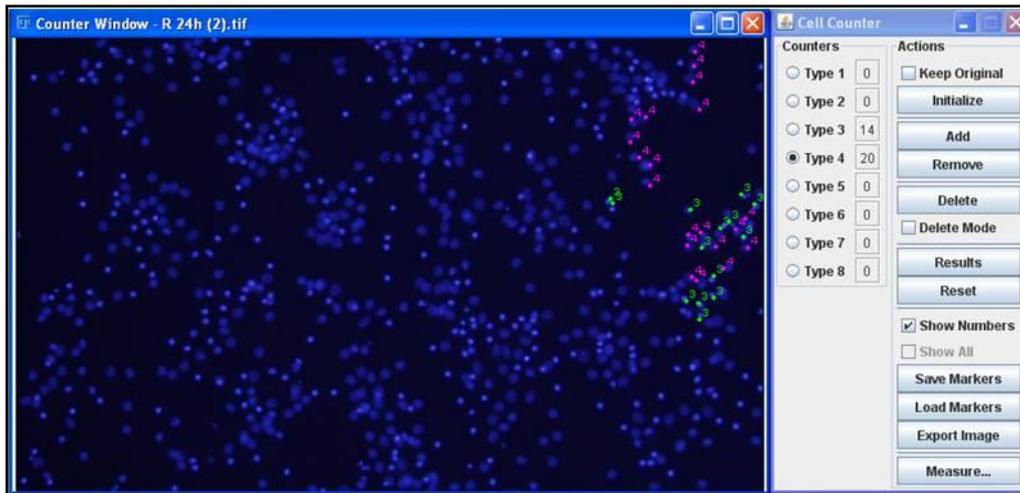


4. Los resultados son copiados en una tabla Excel y se realizan las fórmulas pertinentes para extraer el valor final y el porcentaje de variación entre bandas.

### 16.4 Contaje de células.

Para analizar la supervivencia/mortalidad de los cultivos primarios de neuronas bajo unos tratamientos y condiciones determinadas. Se ha utilizado un *plugin* determinado:

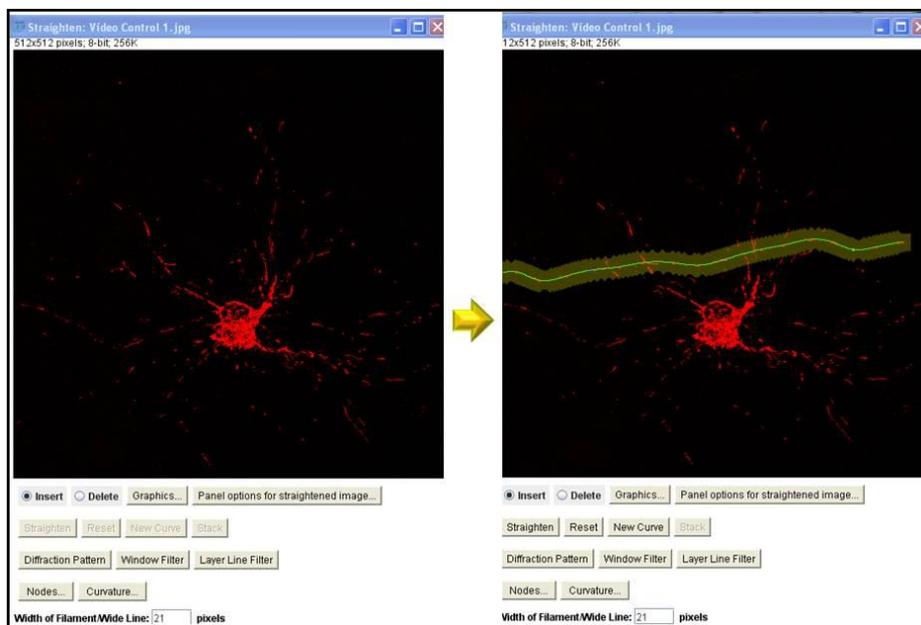
1. Abrir la imagen en el programa. No es necesario modificarla de ninguna forma.
2. Abrir el *plugin* para el contaje de células. *Plugins – Cell counter*.
3. Se abre un nuevo recuadro y se debe apretar el botón *Initialize*. De esta forma, la imagen abierta es reconocida por *plugin* y está lista para ser analizada.
4. En el recuadro aparecen distintos tipos de contadores (*Type 1 – 8*). La única diferencia entre ellos es en qué color pintan los puntos que vayamos haciendo en la imagen.



### 16.5 Movimiento de mitocondrias.

En neuronas, las mitocondrias suelen ser bastante estáticas. A pesar de ello, siempre es posible observar algunos de estos orgánulos trasladándose rápidamente a lo largo de una dendrita o del axón de forma anterógrada o retrógrada. Para analizar este transporte se han transfectado las neuronas con distintas construcciones plasmídicas y tratado con varios tipos de inhibidores.

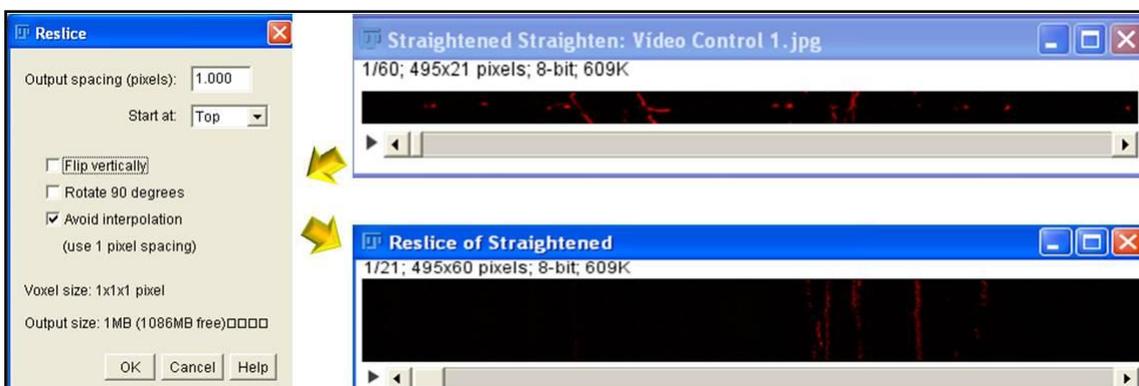
1. Abrir el *Stack* de fotos en el ImageJ. No es necesario modificarla de ninguna forma.
2. Abrir el *plugin Straighten Curved Objects (Plugin – Straighten)*. El *plugin* reconoce la imagen y la abre dentro de un recuadro con unas herramientas determinadas. Apretando en la imagen se van marcando puntos. La idea es seguir una dendrita que se quiera analizar o el axón. Los puntos delimitan a su alrededor un área.



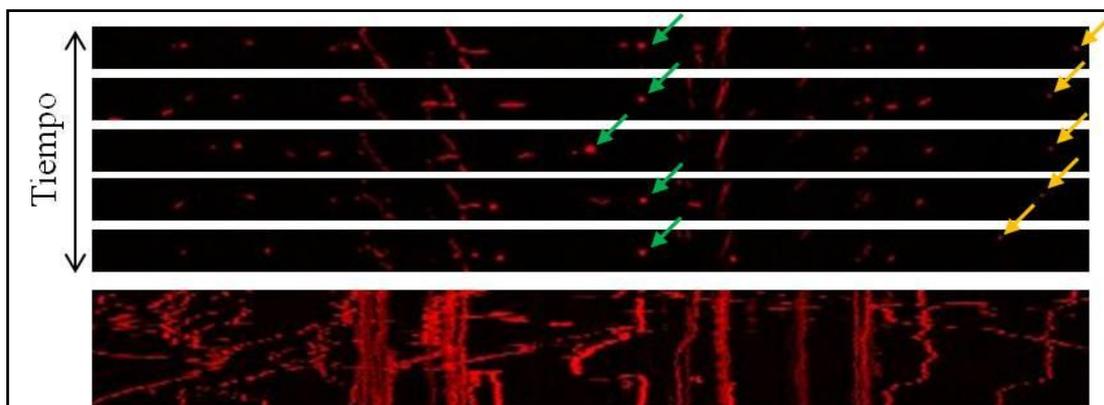
3. Al terminar se aprieta el botón *Straighten* y el *plugin* procede enseñando un nuevo recuadro donde toda la zona marcada dentro del área amarilla se muestra en una imagen rectangular. Este recuadro es una simple imagen de la primera foto del *Stack*. Para obtener el mismo recuadro con la tira de imágenes completa se aprieta el botón *Stack* dentro del cuadro de herramientas.



4. A partir de este punto se trabaja solo con el *Stack*. Para obtener una representación temporal del movimiento de las mitocondrias a lo largo de esta extensión de la neurona, vamos a *Image – Stacks – Reslice [/]*. Aparecerá un cuadro de funciones donde se deben dejar las condiciones pre-establecidas.



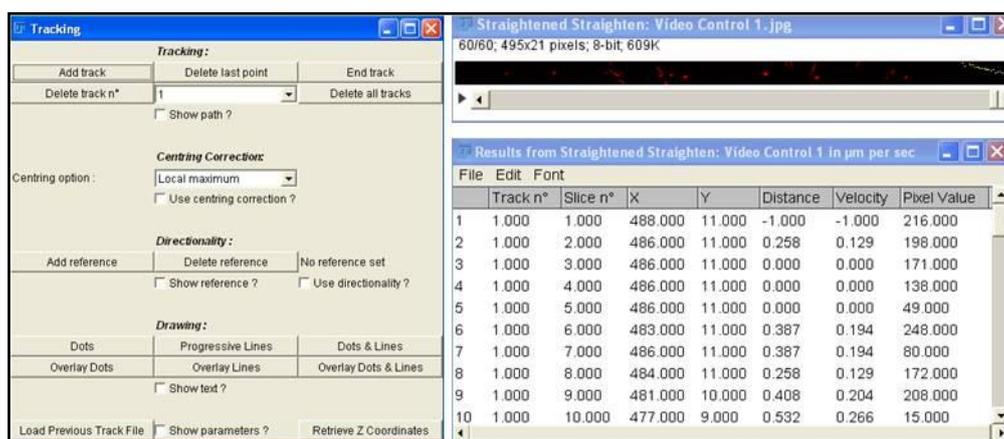
5. Por último, es necesario hacer una proyección de todas las imágenes del nuevo *Stack* obtenido para tener una idea general del movimiento de las mitocondrias a lo largo del tiempo. Los pasos son los siguientes: *Image – Stacks – Z Project*. Las líneas resultantes provienen de cada mitocondria y cuanto más se desplacen estas rayas, más distancia ha recorrido.



Otro análisis que se puede hacer para medir el movimiento de las mitocondrias es calcular su velocidad y la distancia recorrida. Para ello se necesita utilizar el mismo *plugin*, el *Straighten Curved Objects (Plugin – Straighten)*, hasta el paso número 3. Una vez obtenida la imagen

rectangular en formato *Stack*, es decir, donde podemos ver la consecuencia de imágenes tomadas a lo largo del tiempo, se procede de la siguiente forma:

1. Abrir la herramienta necesaria: *Plugin – Manual Tracking*.
2. Se aprieta el botón *Add Track* para que el *plugin* reconozca nuestro *Stack*. En este momento podemos fijarnos en una mitocondria en concreto y, desde la foto número 1 del *Stack*, clicamos encima. Podemos coger como ejemplo la mitocondria marcada con una flecha amarilla de la imagen anterior. Al hacer el primer clic, automáticamente se abre una tabla donde se irán anotando todas las lecturas. Al mismo tiempo, el *Stack* se desplaza a la siguiente imagen. Clicamos de nuevo encima de la mitocondria y así consecutivamente a lo largo de todo el *Stack*. La tabla nos ofrece un resumen de cada pixel donde nos informa de la distancia recorrida en  $\mu\text{m}$  por segundo.



3. A continuación, podemos clicar en los botones del *Drawing* para obtener dibujos del movimiento de los objetos (mitocondrias).

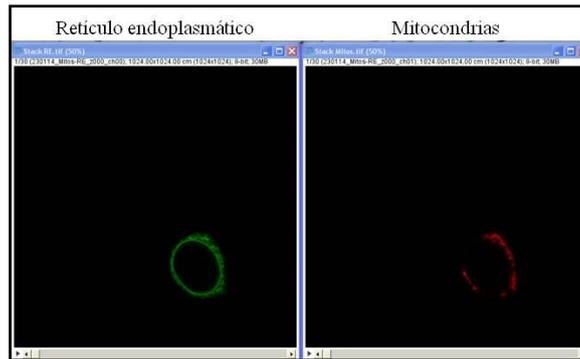
## 16.6 Colocalización de dos objetos.

El estudio de la colocalización de dos o más objetos es un análisis que debe realizarse con criterio. Es muy importante que las imágenes en el microscopio confocal sean tomadas cumpliendo un cierto grado de resolución. Se recomienda trabajar en las siguientes condiciones:

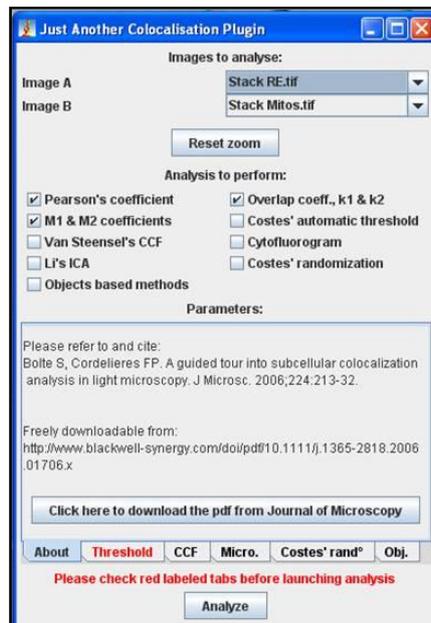
- Tamaño de las imágenes: 1024x1024.
- Intentar subir la intensidad del láser a una señal del 20 – 40 % y bajar entonces el *gain* (es el ruido de fondo o *background*) todo lo posible.
- Limpiar las imágenes con la herramienta *Line Average* mínimo 3 veces.
- Dejar el *pinhole* con el valor predeterminado.
- Para tomar el plano Z utilizar una distancia máxima de 0,25  $\mu\text{m}$ . La distancia mínima y óptima que te ofrece el microscopio es de 0,16  $\mu\text{m}$ .

En estas condiciones las imágenes obtenidas cumplen un estándar de resolución suficiente para poder analizar la colocalización de dos o más objetos con bastante precisión y realismo. Para trabajar se utilizan los *Stacks* descritos en el **apartado 15.1**.

1. Tal como se ha explicado, el archivo LEI se abre en el Fiji y obtenemos los *Stacks* de cada canal, haciendo *Split Channels* (ver **apartado 15.1**). A continuación se muestra un ejemplo de colocalización entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias.



2. Con los *Stacks* abiertos abrimos la herramienta necesaria: *Plugins – JACoP*. El programa directamente reconoce los *Stacks* y los modifica para adaptarlos. Se abre el cuadro de herramientas del *plugin JACoP* y es importante ver que cada *Stack* está representado como imagen A y B y se pueden marcar las opciones de los coeficientes de *Overlap*, *Pearson* y *Manders (M1 & M2)*. En la pestaña de *Threshold* es posible dar unos valores de criterio propio para medir los coeficientes.

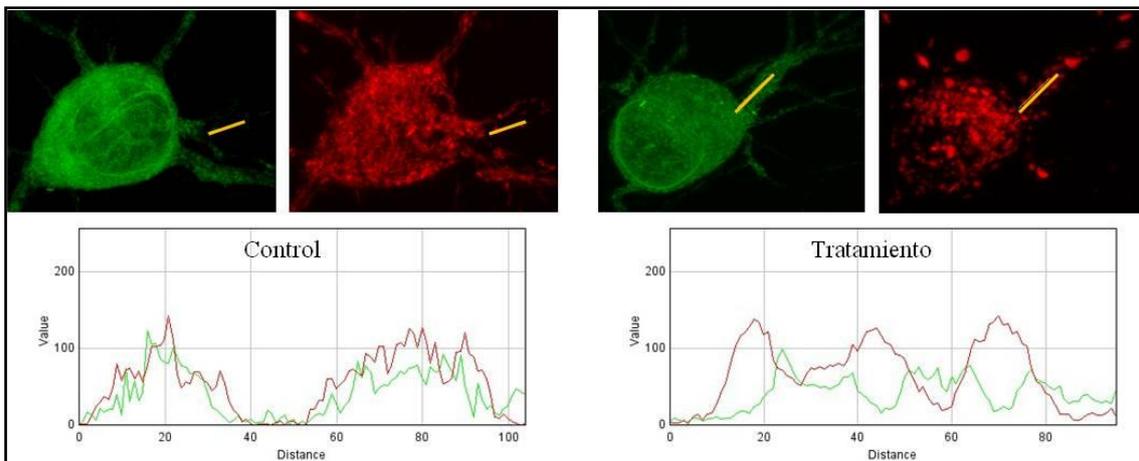


3. A continuación se muestra la comparación entre una neurona control con un porcentaje normal de colocalización entre ambos orgánulos y otra neurona sometida a un tratamiento. Para ello se han utilizado los parámetros descritos en el punto anterior. El coeficiente recomendado es el de *Manders* (Manders, et al. 1993), ya que es utilizado de forma generalizada en la bibliografía. En él nos fijaremos en el valor de B (mitocondrias) sobre A (retículo endoplasmático). Nos basamos en este valor por recomendación del personal técnico de la Unidad de Microscopía Óptica Avanzada. A pesar de ello, también puede hacerse la media entre A y B.



Después de obtener el coeficiente de *Manders*, también es posible hacer un sencillo análisis de colocalización basado en la intensidad de los fluorocromos (la fluorescencia) para obtener una representación más gráfica. A pesar de ello, no hay que olvidar que los coeficientes representan las colocalizaciones de la forma más realista y robusta que hay.

1. En primer lugar se abre el *Stack* desde el archivo LEI original y se obtienen los dos canales separados, tal como se ha descrito con anterioridad. Se mezclan los canales del *Stack: Image – Color – Merge Channels*.
2. Hay que modificar el formato de la imagen: *Image – Type – RGB Color*.
3. Con un ROI trazamos una línea por la zona que queremos cuantificar. A continuación, abrimos el *plugin* determinado: *Plugins – RGB Profiler*. Directamente se nos mostrará un gráfico con las intensidades de cada uno de los canales.
4. Las coordenadas del ROI se pueden guardar para después sobreponerla en la imagen de los otros canales y montar, por ejemplo, la figura que se muestra a continuación: *Analyze – Tools – Roy Manager*.

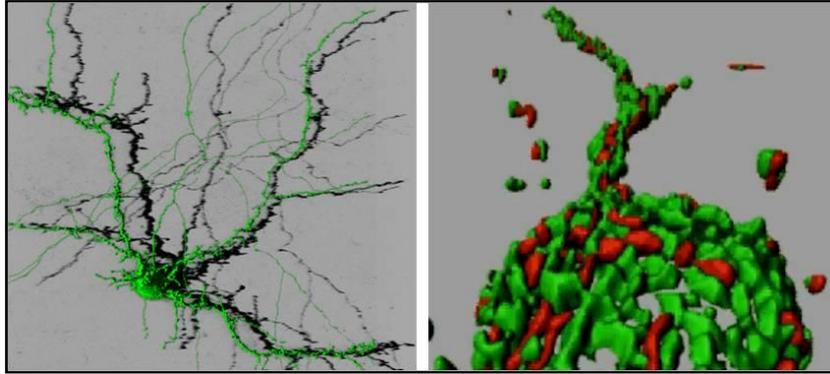


### 16.7 Construcción de imágenes en 3D.

En la Unidad de Microscopía Óptica Avanzada de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona cuentan con los programas de pago Huygens de Scientific Volume Imaging y el Imaris de Bitplane. Ambos *software* se utilizan para obtener representaciones 3D de las imágenes tomadas con el microscopio confocal. Primero de todo es necesario hacer una reconstrucción (deconvolución) de las imágenes tomadas. Esto nos permite obtener una imagen mucho más fiable y nítida ya que se elimina el brillo circundante de los objetos que tienen fluorescencia. Después de esto ya se puede elaborar la reconstrucción en 3D. Se recomienda contactar con el personal técnico de la Unidad para tener acceso y asesoramiento sobre estos programas. A continuación se muestra una neurona representada con un foco de luz que

---

proyecta su sombra sobre un fondo y, a la derecha, la estructura de las mitocondrias (rojo) y el retículo endoplasmático (verde) de otra neurona visto en una reconstrucción en 3D.



### 17. Análisis estadístico.

Para cualquier comparación múltiple dentro de los conjuntos de datos se utilizó el test de la T de student o una ANOVA de una vía seguida por el test *post-hoc* de Bonferroni. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  S.E.M. de al menos tres experimentos independientes ( $n \geq 3$ ).

## ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 1** Listado de anticuerpos primarios utilizados

<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Especie de origen</b>	<b>Concentración</b>	<b>Proveedor / Laboratorio</b>	<b>Técnica</b>
Actina	Mouse	1:10000	Sigma Aldrich (A4700)	Western Blot
Anti-GFP	Rabbit	1:250	Invitrogen (A11122)	Western Blot / Inmunofluorescencia
Anti-HA	Mouse	1:500	Roche (1583816)	Western Blot
Anti-Myc (9E10)	Mouse	1:500	Sigma Aldrich (M4439)	Western Blot
Bax (6A7)	Mouse	1:500	Santa Cruz (sc-23959)	Western Blot / Inmunofluorescencia
Citocromo c (6H2)	Mouse	1:500	Santa Cruz (sc-13561)	Western Blot / Inmunofluorescencia
Citocromo c	Mouse	1:500	BD Biosciences (556432)	Western Blot / Inmunofluorescencia
Drp1/DLP1	Mouse	1:850	BD Biosciences (611112)	Western Blot / Inmunofluorescencia
Drp1 p637	Rabbit	1:500	Biorbyt (orb127984)	Western Blot
Fis1 (FL-152)	Rabbit	1:250	Santa Cruz (sc-98900)	Western Blot
GAPDH (6C5)	Mouse	1:2000	Santa Cruz (sc-32233)	Western Blot
MEF2 (C-21)	Rabbit	1:850	Santa Cruz (sc-313)	Western Blot
Mff (S-15)	Rabbit	1:400	Santa Cruz (sc-168592)	Western Blot
Mfn1 (H-65)	Rabbit	1:250	Santa Cruz (sc-50330)	Western Blot
Mfn2	Mouse	1:2500	Abcam (ab56889)	Western Blot
Opa1	Mouse	1:1000	BD Biosciences (612607)	Western Blot
Phosphoserine (4A4)	Rabbit	1:1000	Millipore (AB1603)	Western Blot
Porina/VDAC1	Mouse	1:10000	Abcam (ab14734)	Western Blot
Spectrina $\alpha$ -II (C-11)	Mouse	1:500	Santa Cruz (sc-46696)	Western Blot

**Tabla 2** Listado de anticuerpos secundarios utilizados

<b>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Especie de origen</b>	<b>Concentración</b>	<b>Proveedor / Laboratorio</b>	<b>Técnica</b>
Alexa Fluor 488	Goat- $\alpha$ Rabbit	1:300	Invitrogen (A11008)	Inmunofluorescencia
$\alpha$ Mouse-HRP	Goat- $\alpha$ Mouse	1:5000	Sigma Aldrich (A4416)	Western Blot
$\alpha$ Rabbit-HRP	Goat- $\alpha$ Rabbit	1:5000	Sigma Aldrich (A6154)	Western Blot
Biotin-SP-conjugated $\alpha$ Mouse	Donkey- $\alpha$ Mouse	1:200	Jackson ImmunoResearch (715-065-150)	Inmunofluorescencia
Biotin-SP-conjugated $\alpha$ Rabbit	Donkey- $\alpha$ Rabbit	1:200	Jackson ImmunoResearch (711-065-152)	Inmunofluorescencia
CyTM3-conjugated Streptavidin		1:500	Jackson ImmunoResearch (016-160-084)	Inmunofluorescencia

**Tabla 3** Listado de plásmidos utilizados

<b>PLÁSMIDOS</b>					
<b>Nombre</b>	<b>Especie de origen</b>	<b>Resistencia</b>	<b>Tag</b>	<b>Proteína/Función</b>	<b>Proveedor / Laboratorio</b>
pRK5-myc-Miro2 Δ593-618	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Miro 2 sin dominio transmembrana	Addgene (47901)
pRK5-myc-Miro2 E208K/E328K	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Miro 2 mutada	Addgene (47900)
pRK5-myc-Miro2	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Proteína Miro 2	Addgene (47891)
pRK5-myc-Miro2 S430N	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Dominante Negativo de Miro 2	Addgene (47899)
pRK5-myc-Miro2 R425V	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Mutante constitutivamente activo de Miro 2	Addgene (47898)
pRK5-myc-Miro2 A13V	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Mutante constitutivamente activo de Miro 2	Addgene (47896)
pRK5-myc-Miro2 T18N	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Dominante Negativo de Miro 2	Addgene (47897)
pRK5-myc-Miro1	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Proteína Miro 1	Addgene (47888)
pRK5-myc-Miro1 E208K/E328K	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Miro 1 mutada	Addgene (47894)
pRK5-myc-Miro1 Δ593-618	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Miro 1 sin dominio transmembrana	Addgene (47895)
pRK5-myc-Miro1 T18N	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Dominante Negativo de Miro 1	Addgene (47890)
pRK5-myc-Miro1 P13V	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Mutante constitutivamente activo de Miro 1	Addgene (47889)
pRK5-myc-RhoA T19N	H. sapiens	Ampicilina	Myc	Dominante Negativo de RhoA	Addgene (12963)
pAc-GFPC1- Sec61β	H. sapiens	Kanamicina	Ac GFP	Proteína Sec61β	Addgene (15108)
2XMyc-LRRK2- WT	H. sapiens	Kanamicina	Myc	Proteína LRRK2	Addgene (25361)
2XMyc-LRRK2- K1347A	H. sapiens	Kanamicina	Myc	LRRK2 mutada	Addgene (25365)
2XMyc-LRRK2- D1994A	H. sapiens	Kanamicina	Myc	LRRK2 mutada	Addgene (25368)
pcDNA-	Sintético	Ampicilina	Primeros	Sensor de calcio	Addgene

4mtD3cpv			28aa de la subunidad 8a de COX humana	mitocondrial	(36324)
pcDNA-D3cpv	Sintético	Ampicilina		Sensor de calcio citoplasmático	Addgene (36323)
pcDNA4TO-hCALML3	H. sapiens	Ampicilina		Proteína calmodulina 3	Addgene (47601)
EGFP-Bak	H. sapiens	Kanamicina	EGFP	Proteína Bak	Addgene (32564)
hBax C3-EGFP	H. sapiens	Kanamicina	C3-EGFP	Proteína Bax	Addgene (19741)
pCEP4-HA-BAX	H. sapiens	Ampicilina	2x HA	Proteína Bax	Addgene (16587)
Mfn1-Myc	M. musculus	Ampicilina	Myc	Proteína Mitofusina 1	Addgene (23212)
Mfn2-Myc	M. musculus	Ampicilina	Myc	Proteína Mitofusina 2	Addgene (23213)
Mfn2(K109A)-16xmyc	M. musculus	Ampicilina	16x Myc	Mitofusina 2 GTPasa mutada	Addgene (26051)
EGFP-Tubulin wt	H. sapiens	Ampicilina	EGFP	Proteína Tubulina	Addgene (30487)
pGFP-Cytochrome c	H. sapiens	Kanamicina	GFP	Proteína Citocromo c	Addgene (41181)
3541 pMIG Bcl-XL	H. sapiens	Ampicilina		Proteína Bcl-XL	Addgene (8790)
pCEP4 Bcl-2	H. sapiens	Ampicilina		Proteína Bcl-2	Addgene (16461)
GW1CMV-Perceval	Sintético	Ampicilina	5'UTR	Monitorizar ratio ATP:ADP	Addgene (21737)
Mff-Myc			Myc	Proteína Mff	Laboratorio Alexander M. van der Blik
Mff-GFP			GFP	Proteína Mff	Laboratorio Alexander M. van der Blik
GFP-Drp1		Ampicilina	GFP	Proteína Drp1	Laboratorio Alexander M. van der Blik
Drp1 WT				Proteína Drp1	Laboratorio Alexander M. van der Blik

Drp1 Myc			Myc	Proteína Drp1	Laboratorio Alexander M. van der Blik
Drp1 HA			HA	Proteína Drp1	Laboratorio Alexander M. van der Blik
Drp1-DN				Dominante Negativo de Drp1	Laboratorio Alexander M. van der Blik
Drp1 S656A		Kanamicina		Drp1 mutada	Laboratorio Stefan Strack
Drp1 S656D		Kanamicina		Drp1 mutada	Laboratorio Stefan Strack
Drp1 S637A 1		Ampicilina		Drp1 mutada	Laboratorio Craig Blackstone
Drp1 S637A 2		Ampicilina		Drp1 mutada	Laboratorio Jennifer Lippincott-Schwartz
Drp1 S616A		Ampicilina		Drp1 mutada	Laboratorio Jennifer Lippincott-Schwartz
Drp1 S579A		Ampicilina		Drp1 mutada	Laboratorio Xin Qi
Drp1 S637D		Ampicilina		Drp1 mutada	Laboratorio Zhigao Wang
Drp1 S693A		Ampicilina		Drp1 mutada	Laboratorio Yi-Ren Hong
Drp1 S693D		Ampicilina		Drp1 mutada	Laboratorio Yi-Ren Hong
Opa3 WT		Kanamicina		Proteína Opa3	Laboratorio Chulhee Choi
Opa3 659S		Kanamicina		Opa3 mutada	Laboratorio Chulhee Choi
Opa3 Δ83-102		Kanamicina		Opa3 mutada	Laboratorio Chulhee Choi
ROCK2 WT		Ampicilina		Proteína ROCK2	Laboratorio Nadia Rosenthal
ROCK2 KD2		Ampicilina		Dominante Negativo de ROCK2	Laboratorio Nadia

					Rosenthal
PA-GFP		Ampicilina	GFP	Molécula mitocondrial fotoactivable	Laboratorio Antonio Zorzano
MitoRED		Ampicilina	RFP	Marcaje RFP de mitocondrias	Laboratorio Antonio Zorzano
MitoGFP		Ampicilina	GFP	Marcaje GFP de mitocondrias	Laboratorio Antonio Zorzano
LC3-GFP		Kanamicina	GFP	Proteína LC3	Laboratorio Antonio Zorzano
CnA				Proteína Calcineurina	Laboratorio Antonio Zorzano
ubc9 DN				Dominante Negativo de ubc9	Laboratorio Hardingham GE
ASK1 WT				Proteína ASK1	Laboratorio Hardingham GE
ASK1-M				ASK1 mutada	Laboratorio Hardingham GE
HA-Mfn2		Ampicilina	HA	Proteína Mitofusina 2	Creación propia
pAAV MEF2 DN		Ampicilina		Dominante Negativo de MEF2	Creación propia
Globina		Ampicilina		Proteína Globina	Creación propia
GFP		Kanamicina	GFP	Proteína GFP	Creación propia
Sh scrambled		Ampicilina	GFP	Small Hairpin RNA control	Creación propia
Sh Mfn2 (1)		Ampicilina	GFP	Small Hairpin RNA contra Mfn2	Creación propia
Sh Mfn2 (2)		Ampicilina	GFP	Small Hairpin RNA contra Mfn2	Creación propia
Sh Mfn2 (3)		Ampicilina	GFP	Small Hairpin RNA contra Mfn2	Creación propia
Sh scrambled (-GFP)		Ampicilina		Small Hairpin RNA control	Creación propia

Sh Mfn2 (1) (-GFP)		Ampicilina		Small Hairpin RNA contra Mfn2	Creación propia
Sh Drp1		Ampicilina		Small Hairpin RNA contra Drp1	Creación propia
siBax				Pool de 4 siRNA contra Bax	Thermo Scientific (24887)
GSK3 $\beta$				Proteína GSK3 $\beta$	Laboratorio Chou CH
GSK3 $\beta$ S9A				Mutante constitutivamente activo de GSK3 $\beta$	Laboratorio Chou CH
GSK3 $\beta$ dead				Dominante Negativo de GSK3 $\beta$	Laboratorio Chou CH
PGAM5 WT				Proteína PGAM5	Laboratorio Wang Z
PGAM5 HA			HA	Proteína PGAM5	Laboratorio Wang Z
PGAM5 S				Proteína PGAM5	Laboratorio Wang Z
PGAM5 L				Proteína PGAM5	Laboratorio Wang Z

**Tabla 4** Listado de *primers* utilizados

<b><i>PRIMERS</i></b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>	<b>Orientación</b>
Mfn1	5'-CAAACCTGCAGCCACCAAGT-3'	Forward
Mfn1	5'-GTTGGCACAGTCGAGCAA-3'	Reverse
Mfn2	5'-ATGTCAAAGGGTACCTGTCCA-3'	Forward
Mfn2	5'-CAATCCAGATGGCAGAACTT-3'	Reverse
SESN2	5'-GGATTATACCTGGGAAGACC-3'	Forward
SESN2	5'-CDCAGTGGATGTAGTTCC-3'	Reverse
18S	5'-GTGGAGCGATTTGTCTGGTT-3'	Forward
18S	5'-CAAGCTTATGACCCGCACTT-3'	Reverse
HC106 (LoxP)	5'-GAAGTAGGCAGTCTCCATCG-3'	Forward
HC108 (LoxP)	5'-CCCAAGAAGAGCATGTGTGC-3'	Reverse
CRE	5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC-3'	Forward
CRE	5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCACCTT-3'	Reverse

**Tabla 5** Listado de inhibidores

<b>INHIBIDORES</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Concepto</b>	<b>Concentración</b>	<b>Proveedor</b>
Mdivi-1	Inhibidor de Drp1	25 $\mu$ M	Calbiochem (475856)
SB203580	Inhibidor de la quinasa p38	10 $\mu$ M	Millipore (559389)
Bis-1	Inhibidor de la PKC	0,5 $\mu$ M	Sigma (R136)
KN-62	Inhibidor de la CaMKI $\alpha$	25 $\mu$ M	Sigma (I2142)
Ácido Okadaico	Inhibidor fosfatasas tipo 1 y 2A	100 nM	Abcam (ab120375)
Ciclosporina A	Inhibidor de la Calcineurina	1 $\mu$ M	Millipore (239835)
Roscovitina	Inhibidor CDK1/Ciclina B	25 $\mu$ M	Sigma (R7772)
7-Nitroindazole	Inhibidor de la NO sintasa	5 $\mu$ M	Sigma (N7778)
Y-27632	Inhibidor de ROCK2	10 $\mu$ M	Sigma (Y0503)
Fasudil	Inhibidor de ROCK2	10 $\mu$ M	Santa Cruz (sc-203418)
MG-132	Inhibidor del proteasoma	10 $\mu$ M	Calbiochem (474790)
Actinomicina D	Inhibidor de la transcripción	10 $\mu$ M	Sigma (A1410)
Ciclohexamina	Inhibidor de la traducción	10 $\mu$ M	Sigma (C-7698)
Calpeptina	Inhibidor de Calpaína	10 $\mu$ M	Calbiochem (03-34-0051)
zVAD	Inhibidor de las Caspasas	20 $\mu$ M	Promega (G7231)
BAPTA	Molécula que une calcio	10 $\mu$ M	Life Technologies (B-1205)
TTFA	Inhibe el complejo II de la cadena respiratoria	50 $\mu$ M	Sigma (T27006)
Rotenona	Inhibe el complejo I de la cadena respiratoria	10 $\mu$ M	Sigma (R8875)
Thapsigargin	Inhibe SERCA (canal ATPasa de calcio del retículo endoplasmático)	10 $\mu$ M	Santa Cruz (sc-24017)
MK-801	Inhibidor del receptor NMDA	10 $\mu$ M	Calbiochem (475878)
Nocodazole	Inhibidor de la polimerización de la tubulina	10 $\mu$ M	Santa Cruz (sc-31430-18-9)
Cytochalasina	Inhibidor de la polimerización de la actina	1 $\mu$ M	Sigma (C-8273)
Caféina	Antagonista del receptor adenosina y promueve la liberación del Ca <sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares	20 $\mu$ M	Sigma (C0750)

**Tabla 6** Listado de *kits* utilizados

<b><i>KITS</i></b>		
<b>Nombre</b>	<b>Concepto</b>	<b>Proveedor</b>
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Recuperación de plásmidos	Qiagen (27104)
<i>QIAprep Spin Midiprep Kit</i>	Recuperación de plásmidos	Qiagen (12643)
<i>QIAprep Spin Maxiprep Kit</i>	Recuperación de plásmidos	Qiagen (12263)
<i>Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Recuperación fragmentos de DNA de geles de agarosa	Promega (A9282)
<i>BCA Protein Assay</i>	Cuantificación de proteínas	Pierce (23225)
<i>Centrifugal Filter Units</i>	Columna de purificación de proteínas	Millipore (UFC501096)
<i>PureLink<sup>®</sup> RNA Mini Kit</i>	Extracción de RNA	Life Technologies (12183018A)
<i>BD Adeno-X<sup>™</sup> Virus Purification Kit</i>	Purificación de adenovirus	BD Biosciences (631533)
<i>ATPlite<sup>™</sup> Luminescence Assay System Kit</i>	Medir los niveles de ATP	PerkinElmer (6016941)
<i>NAD<sup>+</sup>/NADH Glo Assay</i>	Medir los niveles de NAD <sup>+</sup> /NADH	Promega (G9071)

**Tabla 7** Listado de enzimas, reactivos y productos utilizados

<b>ENZIMAS, REACTIVOS Y PRODUCTOS VARIOS</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Concepto</b>	<b>Proveedor / Laboratorio</b>
AraC (Cytosine $\beta$ -D-arabinofuranoside hydrochloride)	Inhibidor de la replicación del DNA	Sigma (C6645)
Laminina	Para preparar el coating de los cultivos primarios de neuronas	Sigma (cat. 21090-022-500 ml)
Poli-D-Lisina	Para preparar el coating de los cultivos primarios de neuronas	BD Biosciences (cat. 354210) o Sigma (P7886-271106)
<i>Kynurinate Magnesium</i>	Utilizado para preparar la solución de disección	Sigma (K3375)
Latex de papaína	Enzima utilizado para la disgregación enzimática de las cortezas cerebrales	Worthington Biochem (3126)
Betadine	Evitar cualquier posible contaminación de las cortezas de rata recién extraídas	Meda (997437.4)
Bacterias JM109 E.coli	Bacterias competentes para transformar	Promega (P9751)
Penicilina/Estreptomicina	Antibiótico para los medios de cultivo	BioWhittaker o Gibco BRL
Suero bovino fetal (FBS)	Suero para los medios de cultivo	Gibco BRL
Tripsina	Para despegar de la placa las células HEK 293	Gibco BRL
1 kb plus <i>DNA ladder</i>	Marcadores de peso molecular	Promega (G571A)
EcoRI	Enzima de restricción	Promega (R601A)
BamHI	Enzima de restricción	New England Biolabs (R0136S)
Ligasa T4	Enzima de ligación	Promega (M1801)
Taq polimerasa	Enzima para llevar a cabo la reacción de PCR	Invitrogen (10966-034)
Pfu DNA polimerasa	Enzima para mutagénesis dirigida	Promega (M7745)
<i>GoTaq® qPCR Master Mix</i>	Enzima para genotipar	Promega (A600A)
<i>Buffer Green</i>	Buffer para genotipar	Promega (M791A)

dNTPs	Nucleótidos necesarios para las reacciones de PCR	Invitrogen (10297-018)
DpnI	Enzima de restricción	Promega (R623A)
BD3.1	Enzima para las reacciones de secuenciación	Life Technologies (4337454)
<i>Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000</i>	Para transfectar los cultivos celulares	Invitrogen (11668-027)
ECL ( <i>Enhanced Chemiluminescence</i> )	Reacción quimioluminiscente para los Western Blot	Biological Industries (20-500-120)
<i>Cocktail Set III</i>	Inhibidor de proteasas	Calbiochem (539134)
<i>Cocktail 2 y 3</i>	Inhibidores de fosfatasas	Sigma (5726 y 0044)
Fluoro-Jade C	Marcaje de neuronas muertas en tejido por inmunofluorescencia	Histo-Chem Inc. (1FJC)
Microesferas magnéticas de proteína A/G	Para la captura de proteínas durante la co-inmunoprecipitación	Thermo Scientific (88803)
<i>Super Script III First Strand Synthesis Super M</i>	Síntesis de cDNA	Invitrogen (11752-050)
<i>GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix</i>	Para la reacción de RT-PCR	Promega (A6002)
Indo-1	Medir la concentración de calcio intracelular	Life Technologies (I1223)
Fluo-4	Medir la concentración de calcio intracelular	Invitrogen (F-14201)
Rhod-2	Medir la concentración de calcio mitocondrial	Invitrogen (R-1245MP)
Ionicina	Provoca la entrada masiva de calcio al interior de la célula	Sigma (10634)
Nonidet P40	Permeabiliza las células	Fluka (4385)
<i>Vectashield</i>	Medio de montaje con DAPI	Vector Laboratories (H-1200)
<i>Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM)</i>	Sonsa para medir el potencial de membrana mitocondrial	Sigma (T5428)
<i>Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP)</i>	Provoca el desacoplamiento total del potencial de membrana mitocondrial	Sigma (C2759)

**Tabla 8** Listado de equipos utilizados

<b>EQUIPOS</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Proveedor / Laboratorio</b>
Homogenizador (tipo <i>tight-fitting glass-Teflon homogenizer</i> )	Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología (Universidad de Barcelona)
Cabinas Bio-II-A	Telstar
Incubadora Jouan IGO150 Cell Life	Thermo Fisher Scientific
Microcentrífuga Refrigerada	Eppendorf (5424R)
Ultracentrífuga Refrigerada Jouan CR4.12	Thermo Fisher Scientific
Fluorímetro Infinite® M200PRO	Tecan
StepOne Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Criostato CM3050 S	Leica
Cámara de Hipoxia	Stemcell Technologies (27310)
Regulador de volumen de gas para la cámara de Hipoxia	Stemcell Technologies (27311)
Microscopio óptico Axiovert 40 C	Zeiss
Microscopio de fluorescencia	Olympus BX61/BX62
Microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SP2	Leica Lasertechnik GmbH

---

---

## OBJETIVOS

---

---

El **Objetivo** de esta Tesis es profundizar en la regulación de la dinámica mitocondrial en excitotoxicidad y la implicación de las principales proteínas involucradas en la maquinaria de fusión/fisión como Drp1 y Mfn2, así como su papel en la supervivencia neuronal y el buen funcionamiento de las mitocondrias.

Subobjetivos:

1. Estudiar el papel de las principales proteínas implicadas en la regulación de la dinámica mitocondrial en excitotoxicidad.
2. Analizar cómo la dinámica mitocondrial afecta la homeóstasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en excitotoxicidad.
3. Examinar las principales vías de muerte celular y su relación con la dinámica mitocondrial.
4. Conocer cómo la dinámica mitocondrial afecta los procesos de autofagia.

---

---

## RESULTADOS

---

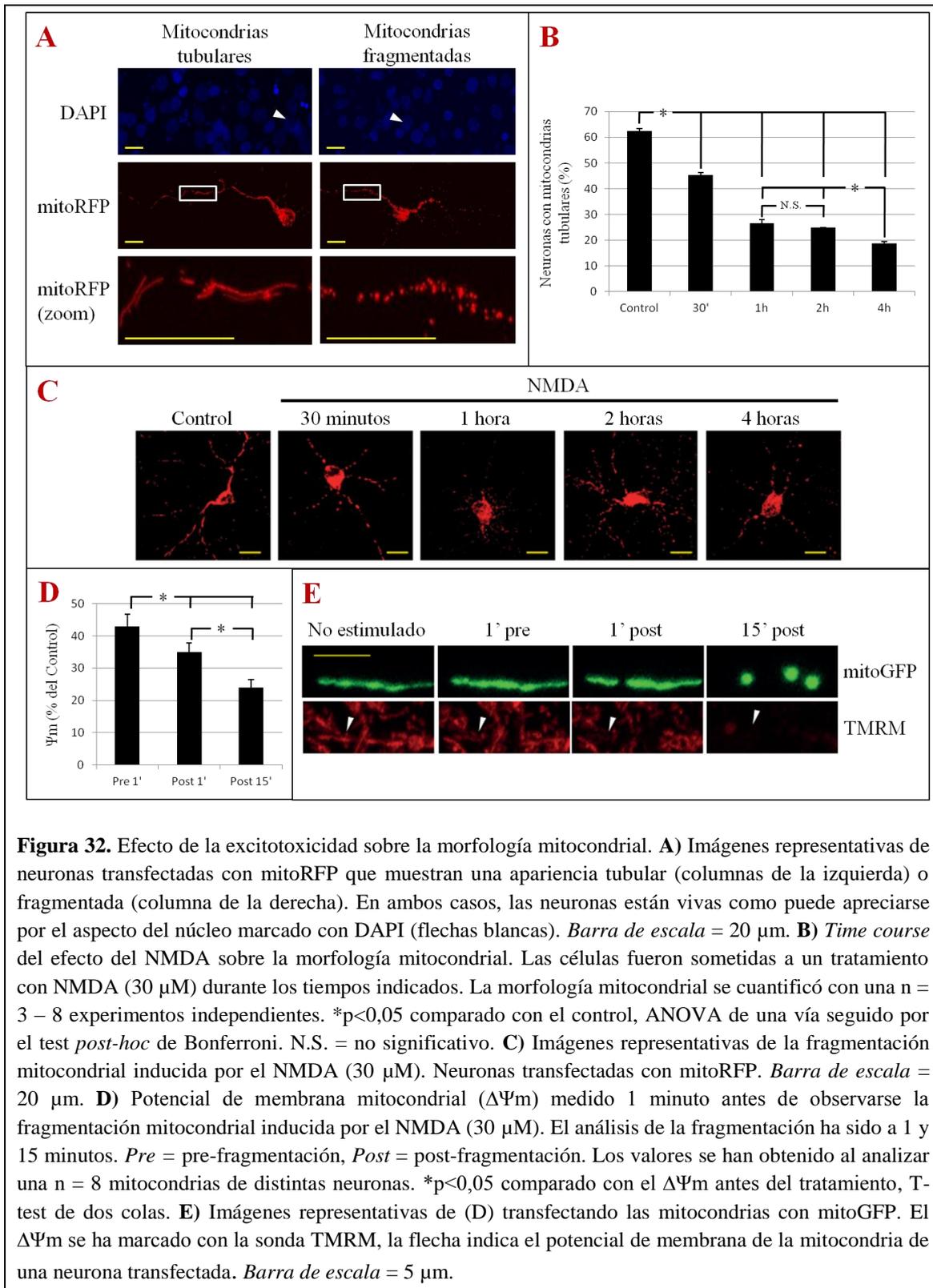
---

## LA FASE TEMPRANA DE LA FRAGMENTACIÓN MITOCONDRIAL EN EXCITOTOXICIDAD DEPENDE DE LA ACTIVACIÓN Y RECLUTAMIENTO DE DRP1

### Alteración de la morfología mitocondrial ante el efecto de la excitotoxicidad

La relación entre la morfología mitocondrial y excitotoxicidad, como los mecanismos moleculares implicados, no se conocen bien (Rintoul GL, et al. 2003; Young KW, et al. 2010; Jahani-Asl A, et al. 2011). En cultivos primarios de neuronas corticales de rata nos propusimos medir el efecto que la excitotoxicidad causa sobre las mitocondrias a nivel morfológico. Para ello se trabajó con concentraciones moderadamente tóxicas (30  $\mu$ M) de NMDA, un agonista del receptor del glutamato y los tratamientos se establecieron en un *time course* de 30 minutos y 1, 2 y 4 horas. Se analizó el porcentaje de neuronas fijadas con paraformaldehído con mitocondrias tubulares utilizando un vector de expresión de RFP con localización en la matriz mitocondrial (mitoRFP). Las neuronas muertas fueron descartadas tras observar los núcleos de las células marcados con DAPI (**Figura 32 A**). Importante remarcar que en un estado basal/normal como es el caso del control, el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares es de alrededor del 60 %. Esto significa que el 40 % restante son células, todavía vivas por presentar un núcleo en buenas condiciones, pero con las mitocondrias fragmentadas. Teniendo en cuenta el gran dinamismo de las mitocondrias y que estas están continuamente fusionándose y fisionándose, podemos pensar que este porcentaje de células no están necesariamente destinadas a morir por apoptosis o necrosis por el simple hecho de contener las mitocondrias fragmentadas. Durante los primeros 60 minutos de tratamiento con NMDA la cantidad de neuronas con mitocondrias tubulares decae en más de un 50 %. Los valores se mantienen durante una hora más y vuelven a sufrir una caída a las 4 horas (**Figura 32 B, C**). Una excesiva entrada de calcio a la célula durante la excitotoxicidad provoca la despolarización de las mitocondrias (Soriano FX, et al. 2006b; Nicholls DG, 2009). Esto produce la activación de la calcineurina que se ha demostrado que puede desfosforilar a Drp1 y activarla promoviendo su reclutamiento a la mitocondria para fisionarla (Cereghetti GM, et al. 2008). A raíz de ello analizamos con más detalle si esta fragmentación mitocondrial era precedida o posterior a la despolarización de las mitocondrias. Se observó que un minuto antes de producirse la fisión el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) había caído un 60 % con respecto al total del potencial que había al inicio del experimento. Justo un minuto después de producirse la fragmentación, el  $\Delta\Psi_m$  sufría una nueva caída significativa que continuaba progresivamente (**Figura 32 D, E**).

Los resultados de la fragmentación mitocondrial (**Figura 32 B**) muestran que hay dos episodios separados en el tiempo en que las mitocondrias se fisionan ante un estímulo excitotóxico. La primera ocurre justo al inicio de la excitotoxicidad, sería la fase temprana. Estos valores se mantienen hasta que a partir de la cuarta hora vuelven a disminuir, las mitocondrias vuelven a fragmentarse, es la fase tardía.



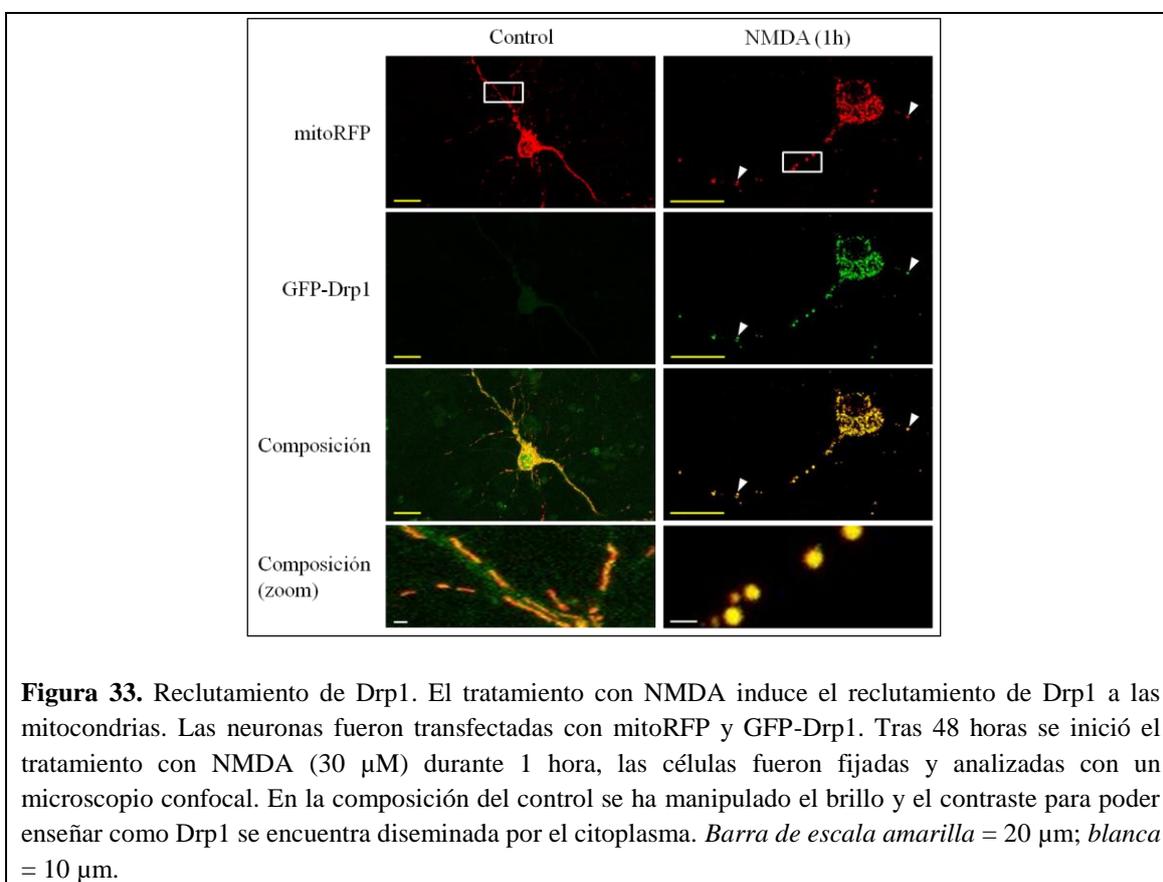
**Figura 32.** Efecto de la excitotoxicidad sobre la morfología mitocondrial. **A)** Imágenes representativas de neuronas transfectadas con mitoRFP que muestran una apariencia tubular (columnas de la izquierda) o fragmentada (columna de la derecha). En ambos casos, las neuronas están vivas como puede apreciarse por el aspecto del núcleo marcado con DAPI (flechas blancas). *Barra de escala = 20 μm.* **B)** *Time course* del efecto del NMDA sobre la morfología mitocondrial. Las células fueron sometidas a un tratamiento con NMDA (30 μM) durante los tiempos indicados. La morfología mitocondrial se cuantificó con una n = 3 – 8 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. N.S. = no significativo. **C)** Imágenes representativas de la fragmentación mitocondrial inducida por el NMDA (30 μM). Neuronas transfectadas con mitoRFP. *Barra de escala = 20 μm.* **D)** Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) medido 1 minuto antes de observarse la fragmentación mitocondrial inducida por el NMDA (30 μM). El análisis de la fragmentación ha sido a 1 y 15 minutos. *Pre* = pre-fragmentación, *Post* = post-fragmentación. Los valores se han obtenido al analizar una n = 8 mitocondrias de distintas neuronas. \*p<0,05 comparado con el  $\Delta\Psi_m$  antes del tratamiento, T-test de dos colas. **E)** Imágenes representativas de (D) transfectando las mitocondrias con mitoGFP. El  $\Delta\Psi_m$  se ha marcado con la sonda TMRM, la flecha indica el potencial de membrana de la mitocondria de una neurona transfectada. *Barra de escala = 5 μm.*

### La activación de Drp1 induce la fragmentación mitocondrial temprana en excitotoxicidad

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos donde se ha demostrado que la excitotoxicidad promueve la fragmentación de las mitocondrias durante los primeros 60 minutos de tratamiento,

fase temprana, cabría esperar que la activación de Drp1, la principal proteína que media la fragmentación mitocondrial, fuese la responsable. Drp1 es una GTPasa citosólica que forma parte de la superfamilia de las proteínas dinaminas. Lo que realmente determina la actividad de Drp1 es su localización subcelular. Mediante distintos tipos de modificaciones post-traduccionales, Drp1 es reclutada a las mitocondrias vía sus dos posibles receptores Mff y/o Fis1; siendo el primero de ellos el candidato más aceptado (James DI. et al. 2003; Yoon Y. et al. 2003; Gandre-Babbe S. & van der Blik AM. 2008).

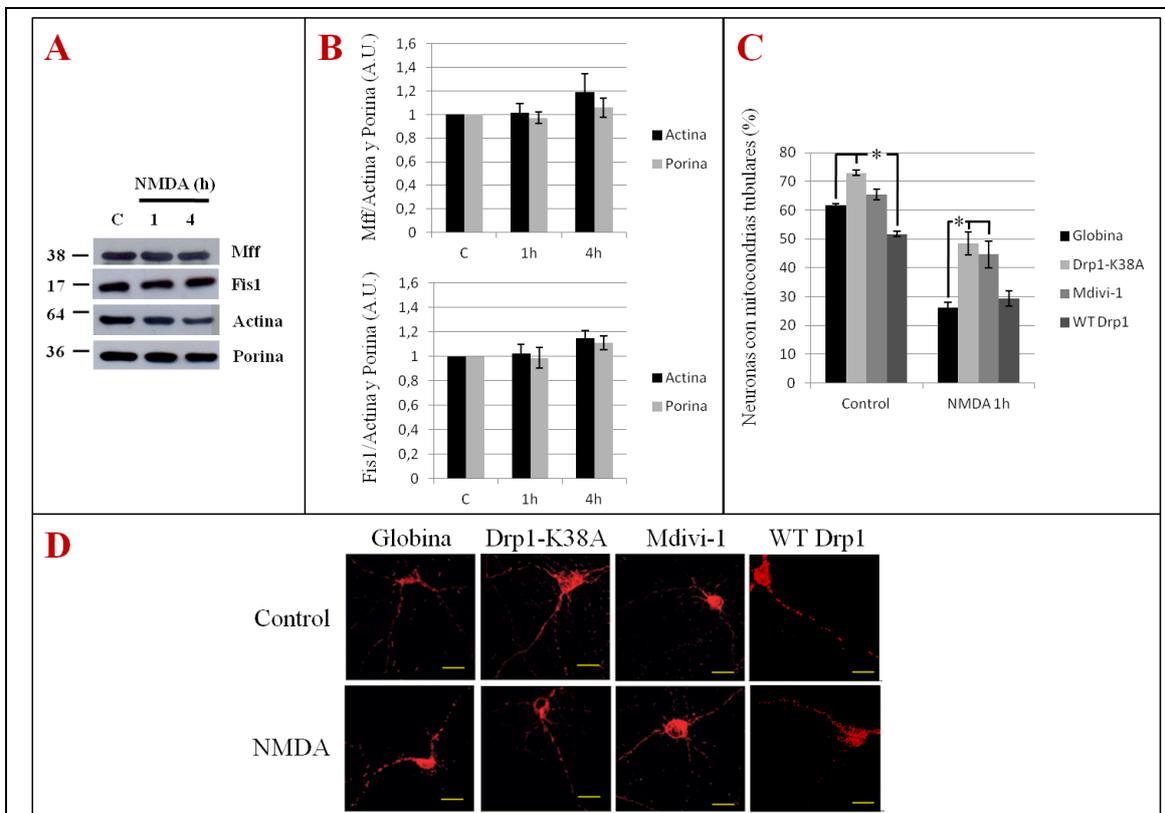
Para conocer e identificar la localización subcelular de Drp1 en condiciones excitotóxicas se transfectaron las neuronas con un vector que expresa GFP-Drp1. En la **Figura 5.33** se muestra que en condiciones normales Drp1 se mantiene en el citoplasma mostrando una señal difusa y poco intensa. Si tratamos el cultivo con NMDA durante 1 hora, se observa una fuerte co-localización por parte de Drp1 y las mitocondrias que han sido marcadas con el vector de expresión de RFP que localiza en la matriz mitocondrial (mitoRFP).



**Figura 33.** Reclutamiento de Drp1. El tratamiento con NMDA induce el reclutamiento de Drp1 a las mitocondrias. Las neuronas fueron transfectadas con mitoRFP y GFP-Drp1. Tras 48 horas se inició el tratamiento con NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora, las células fueron fijadas y analizadas con un microscopio confocal. En la composición del control se ha manipulado el brillo y el contraste para poder enseñar como Drp1 se encuentra diseminada por el citoplasma. *Barra de escala amarilla = 20  $\mu$ m; blanca = 10  $\mu$ m.*

Sabiendo que Drp1 parece ser la responsable de fragmentar las mitocondrias durante los primeros minutos de la excitotoxicidad, nos planteamos intentar averiguar mediante que tipo o tipos de modificaciones post-traduccionales Drp1 es activada en este contexto. En primer lugar se analizó mediante Western Blot si los niveles proteicos de los dos posibles receptores (Mff y Fis1) de Drp1 en la membrana externa de la mitocondria estaban alterados. La densitometría normalizada por actina y la proteína mitocondrial porina (para comprobar que no hubiese ningún cambio en la masa total de las mitocondrias) no mostró ningún tipo de cambio tras 1 y 4 horas de tratamiento con NMDA (**Figura 34 A, B**). A continuación decidimos probar el inhibidor Mdivi-1 y sobreexpresar distintos vectores que afectan la actividad de Drp1 para poder

estudiar de este modo si existe la posibilidad de evitar o promover la fragmentación mitocondrial. En primer lugar observamos que al sobreexpresar un plásmido que codifica para la proteína Drp1 nativa (WT) en condiciones control ya provoca una caída significativa del porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares (**Figura 34 C, D**). En cambio, tras una hora de tratamiento con NMDA los resultados son los mismos que en la situación control. Por otro lado también se transfectó un vector que expresa una forma mutada de Drp1 (Drp1-K38A), que actúa como un dominante negativo (Smirnova E, et al. 1998). En este contexto, tanto en la situación control como después de una hora de tratamiento con NMDA, se consigue aumentar de forma significativa el porcentaje de neuronas con mitocondrias con aspecto tubular enfrente de las fragmentadas. El Mdivi-1 es una droga sintética descrita en 2008 capaz de inhibir específicamente la actividad de Drp1 (Cassidy-Stone A, et al. 2008). En nuestro modelo experimental hemos probado su eficiencia y se ha visto que es capaz de evitar parcialmente la fragmentación mitocondrial tras el tratamiento con NMDA (**Figura 34 C, D**).



**Figura 34.** El reclutamiento de Drp1 es independiente de un aumento en los niveles proteicos de Mff y Fis1. **A)** Western Blot contra Mff y Fis1 de extractos totales de proteína de cultivos primarios de neuronas sometidas a 1 y 4 horas de tratamiento con NMDA (30  $\mu$ M). **B)** Densitometría normalizada por actina y por porina. Cuantificación con una  $n = 6$  experimentos independientes. **C)** Efecto del NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora sobre la morfología mitocondrial de neuronas transfectadas con plásmidos que codifican mtRFP + Drp1-K38A, WT Drp1 o Globina (control). Mdivi-1, un inhibidor específico de Drp1, se aplicó durante 1 hora antes de la estimulación con NMDA a una concentración de 30  $\mu$ M. La morfología mitocondrial se cuantificó con una  $n = 3$  experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. **D)** Imágenes representativas mostrando el efecto de los inhibidores farmacológicos y genéticos al bloquear el reclutamiento de Drp1 a la mitocondria. Las neuronas fueron transfectadas con mitoRFP. Barra de escala = 20  $\mu$ m.

---

Puesto en común, estos resultados nos muestran que la fragmentación mitocondrial ocurrida durante los primeros 60 minutos tras el inicio de la excitotoxicidad es debida al reclutamiento de Drp1 a la mitocondria. Este reclutamiento puede entorpecerse al sobreexpresar una forma dominante negativo o un inhibidor específico de Drp1 consiguiendo mantener más porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares. Se han descrito múltiples modificaciones post-traduccionales como fosforilación, nitrosilación, ubiquitinización y SUMOilación que afectan la actividad de Drp1 (Otera H, et al. 2013). A pesar de ello, hay pocas evidencias sobre su mecanismo de activación en excitotoxicidad, por lo que decidimos indagar en este camino.

*Drp1 parece ser activada mediante una combinación de modificaciones post-traduccionales en excitotoxicidad*

La línea neuronal SH-SY5Y y cultivos primarios de neuronas de ratas modelos de encefalopatía se ha descrito que la quinasa PKC $\delta$  induce la fragmentación mitocondrial mediante la fosforilación de Drp1 en la Serina 579 (Qi X, et al. 2011). Para corroborar si en excitotoxicidad ocurre el mismo efecto aplicamos a las neuronas corticales Bis-1 (0,5  $\mu$ M), un inhibidor de PKC, 30 minutos antes del tratamiento de 1 hora con NMDA (30  $\mu$ M) (**Tabla 9 A**). Los resultados obtenidos tras cuantificar el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares no mostraron ningún efecto significativo por parte de Bis-1. De modo que PKC parece no actuar en la fragmentación mitocondrial mediante la fosforilación y activación de Drp1 en excitotoxicidad.

Tal como se ha comentado con anterioridad, Drp1 puede ser activada por múltiples tipos de modificaciones post-traduccionales (Otera H, et al. 2013). Para testar más rutas posibles se probaron varios inhibidores de proteínas clave que ya han sido descritas como activadoras de Drp1 mediante fosforilación/defosforilación en distintos contextos. Con todos ellos se trabajó de la misma forma, analizando el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares después de aplicar el inhibidor indicado durante 30 minutos antes de empezar el tratamiento de 1 hora con NMDA (30  $\mu$ M). Con ninguno de ellos se obtuvieron resultados significativos que mostraran que las vías descritas a continuación estuviesen involucradas (**Tabla 9 A**). Se empezó probando el KN-62 (25  $\mu$ M), un inhibidor de la CaMKI $\alpha$ . En 2008 se describió que la entrada de calcio a través de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje activa la quinasa CaMKI $\alpha$  promoviendo la fosforilación de Drp1 en la Serina 600 (Han XJ, et al. 2008). Otro inhibidor que se probó fue el Ácido Okadaico (100 nM). Éste actúa sobre las fosfatasa de tipo 1 y 2A. Se utilizó para inhibir la acción de la fosfatasa PP2A/B $\beta$ 2 descrita como activador de Drp1 en neuronas al defosforilar la Serina 656 (Dickey AS & Strack S. 2011), un residuo conocido por ser fosforilado e inhibido por PKA cuando éste es reclutado a la membrana externa de la mitocondria vía AKAP1 (Cribbs JT & Strack S, 2007). También se probó la Ciclosporina A (1  $\mu$ M), un clásico inhibidor utilizado para actuar sobre la Calcineurina, una fosfatasa tipo 2B. A diferencia de PP2A/B $\beta$ 2, la Calcineurina actúa sobre la Serina 637 de Drp1 activándola y provocando su traslocación a la mitocondria, lugar donde promueve la fragmentación. Por último, se testó la Roscovitina a (25  $\mu$ M) un inhibidor de CDK1/Ciclina B. En células HeLa sincronizadas en su ciclo celular se observó que las mitocondrias se fragmentan durante las primeras fases de la mitosis por la activación de Drp1 al ser fosforilada por CDK1/Ciclina B en la Serina 585 (Taguchi N, et al. 2007) (**Tabla 9 A**).

Se ha descrito que p38 puede activarse en isquemia e hipoxia (Ghatan S, et al. 2000). Se decidió probar si dicha activación podría promover el reclutamiento de Drp1 a la mitocondria y

---

promover su fragmentación ya que p38 parece inducir la muerte celular. Se utilizó SB203580 (10  $\mu$ M) un inhibidor específico de p38 durante 30 minutos antes de empezar el tratamiento. Los experimentos no mostraron ningún efecto en la situación control y solamente una pequeña mejoría no significativa en el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares tras una hora de tratamiento con NMDA, dando a entender que p38 no está involucrado en la activación de Drp1 en excitotoxicidad (**Tabla 9 A**). Al mismo tiempo se probó de sobreexpresar vectores que codifican para ASK, una MAPKKK, ya que puede inducir apoptosis (Ichijo H, et al. 1997) y nos planteamos si ASK1 podría estar activando Drp1 de forma directa o indirecta en excitotoxicidad. Teniendo en cuenta este posible vínculo y las evidencias bibliográficas que apuntan a una posible interacción entre Drp1 y proteínas pro-apoptóticas como Bax (Karbowski M, et al. 2002), se decidió trabajar con un dominante negativo y una forma mutada de ASK1. Las neuronas fueron transfectadas con estos vectores y sometidas a NMDA 30  $\mu$ M durante una hora. Ningún resultado fue significativo a pesar de observar unos efectos interesantes en el aumento del porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares al sobreexpresar la variedad mutada de ASK1 en la situación control (**Tabla 9 B**).

La proteína E3 ligasa Keap1 es conocida porque promueve la degradación del factor de transcripción Nrf2 y es muy estudiado en cáncer (Jaramillo MC & Zhang DD, 2013). En situación de estrés oxidativo, se ha descrito que la fosfatasa PGAM5 puede unir el complejo formado por Keap1+Nrf2 a la membrana externa de las mitocondrias promoviendo la degradación de Bcl-xL y la subsecuente muerte por apoptosis (Lo SC & Hannink M, 2006; Lo SC & Hannink M, 2009; Xu Y, et al. 2013). Se sobreexpresó en neuronas la proteína E3 ligasa Keap1 para ver si era posible bloquear la fragmentación. Pero no se obtuvieron resultados que indicasen una clara vinculación de Keap1 con la fisión mitocondrial en nuestro modelo (**Tabla 9 B**).

Ninguno de todos estos inhibidores descritos nos aportó información sobre la posible vía de activación de Drp1 en excitotoxicidad. En la enfermedad de Parkinson se describió que la quinasa LRRK2 se encuentra mutada. LRRK2 es una proteína citosólica pero puede encontrarse en la membrana externa de las mitocondrias donde se ha descrito que fosforila a Drp1 y la activa, aunque el residuo concreto no se conoce todavía (Wang X, et al. 2012). Se transfectaron las neuronas con una forma WT del enzima (LRRK2 WT) o con LRRK2 D1994A y K1347A, dos formas mutadas sin actividad GTPasa de la proteína (**Tabla 9 B**). Si LRRK2 estuviese involucrada en la activación de Drp1 encontraríamos que la sobreexpresión de la forma WT aumentaría la fragmentación mitocondrial tanto en el control como tras 1 hora de tratamiento con NMDA. Por otro lado, al utilizar las variantes mutantes sin actividad GTPasa se debería detectar un aumento en el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares, cosa que no ocurre. LRRK2 parece no jugar ningún papel destacado en este contexto.

En 2012 se describió en células HeLa una nueva diana de fosforilación/inhibición de Drp1 en la Serina 693 mediada por la quinasa GSK3 $\beta$  (Chou CH, et al. 2012). Es una quinasa con múltiples funciones adheridas como el desarrollo celular, la homeóstasis metabólica, la diferenciación y crecimiento neuronal, la polaridad celular y la apoptosis. Teniendo en cuenta que la acción de GSK3 $\beta$  se ha descrito como una inhibición de Drp1, nos planteamos evaluar la posible acción de esta quinasa en las neuronas sometidas a excitotoxicidad. Se transfectaron las neuronas con una forma WT del enzima (GSK3 $\beta$  WT) o con GSK3 $\beta$  S9A y GSK3 $\beta$  death, dos variantes mutadas de la quinasa. Tras tratar el cultivo con NMDA 30  $\mu$ M durante una hora y cuantificar el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares (**Tabla 9 B**), se observó que ninguna de las

formas mutadas de GSK3 $\beta$  es capaz de promover la fisión en situación control y que la forma WT no promueve la fisión mitocondrial tras el tratamiento. Por lo tanto, la quinasa GSK3 $\beta$  parece no actuar sobre Drp1 en excitotoxicidad.

**A**

INHIBIDORES				
Diana	Inhibidor	Concentración	Control	NMDA 1h
Globina	-	-	61,74 $\pm$ 0,65	26,18 $\pm$ 1,75
PKC	Bis-1	0,5 $\mu$ M	72,65 $\pm$ 3,21	27,31 $\pm$ 2,31
p38	SB203580	10 $\mu$ M	59,35 $\pm$ 6,16	33,63 $\pm$ 1,37
CaMKI $\alpha$	KN-62	25 $\mu$ M	73,56 $\pm$ 6,74	19,48 $\pm$ 5,7
PP2A/B $\beta$ 2	Ácido Ocadaico	100 nM	67,66 $\pm$ 10,08	15,84 $\pm$ 6,4
Calcineurina	Ciclosporina A	1 $\mu$ M	47,58 $\pm$ 6,77	21,3 $\pm$ 6,12
CDK1/Ciclina B	Roscovitina	25 $\mu$ M	47,14 $\pm$ 7,14	18,88 $\pm$ 7,77

**B**

VECTORES		
Vector	Control	NMDA 1h
Globina	60,66 $\pm$ 1,35	26,23 $\pm$ 0,64
HA-ASK	68,22 $\pm$ 4,87	28,04 $\pm$ 1,54
ASK-DN	52,57 $\pm$ 5,2	18,59 $\pm$ 1,92
ASK-M	74,37 $\pm$ 4,93	30,8 $\pm$ 7,05
Keap1	57,69 $\pm$ 1,2	30,55 $\pm$ 1,45
LRRK2 WT	89,35 $\pm$ 3,8	26,07 $\pm$ 3,34
LRRK2 D1994A	68,08 $\pm$ 0,34	22,11 $\pm$ 2,88
LRRK2 K1346A	65,24 $\pm$ 0,54	30,77 $\pm$ 3,84
GSK3b WT	77,87 $\pm$ 2,12	19,69 $\pm$ 4,31
GSK3b S9A	69,21 $\pm$ 8,66	22,07 $\pm$ 2,07
GSK3b death	82,42 $\pm$ 8,89	20,63 $\pm$ 2,45

**Tabla 9.** Inhibidores y vectores probados para determinar la activación de Drp1 en excitotoxicidad. Se ha analizado el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares. **A)** Listado de inhibidores con la concentración utilizada y su diana. **B)** Listado de vectores expresados en neuronas. Morfología mitocondrial analizada con una n = 3 experimentos independientes. Los valores están expresados en porcentajes  $\pm$  el error relativo. Globina = Control.

Las proteínas conocidas como SUMO pueden afectar la actividad de Drp1. Su función es estabilizar a Drp1 en la membrana externa de las mitocondrias y promover la fisión a la vez que interacciona con las proteínas pro-apoptóticas Bax/Bak (Wasiak S, et al. 2007). Por otro lado, se ha descrito que la SUMOilación es protectora en isquemia (Lee YJ, et al. 2011), por ello estudiamos el efecto al sobreexpresar un dominante negativo de Ubc9, una de las enzimas E2 conocidas dentro del ciclo de SUMOilación (Scheschonka A, et al. 2007). Los resultados obtenidos fueron contradictorios con lo descrito en la bibliografía ya que al tratar el cultivo durante 1 hora con NMDA (30  $\mu$ M) fue una recuperación parcial del porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares en comparación con el control (**Figura 35 A**).

Dicha recuperación parcial de la morfología mitocondrial también se observó al utilizar el inhibidor de la enzima NO sintasa (nNOS) 7-Nitroindazole a una concentración de 5  $\mu$ M

---

(Figura 35 B). Se ha descrito que la excitotoxicidad mediada por el NMDA estimula la producción de óxido nítrico (NO) en las neuronas activando Drp1 (Barsoum MJ, et al. 2006; Cho DH, et al. 2009). En nuestro modelo de excitotoxicidad, la inhibición de la nNOS produjo una reducción de la fragmentación mitocondrial tras una hora de tratamiento con NMDA.

La fosfatasa PGAM5 se ubica en la membrana externa de las mitocondrias y, ante señales de inducción de necrosis promovidas por el receptor TNF $\alpha$  y las proteínas RIP1 y RIP3, recluta Drp1 a la mitocondria y activa su dominio GTPasa al defosforilar la Serina 637 (Wang Z, et al. 2012). Por otro lado, en células modelo de la enfermedad de Huntington, la fosfatasa Calcineurina también promueve la defosforilación y activación de Drp1 promoviendo la fisión de las mitocondrias y sensibilizando la célula a estímulos apoptóticos (Cribbs JT, et al. 2007; Costa V, et al. 2010). Curiosamente y a diferencia de lo descrito con anterioridad, nuestros resultados al tratar las neuronas con NMDA (30  $\mu$ M) y promover excitotoxicidad ha sido justo lo contrario. Se ha detectado un aumento significativo en los niveles de neuronas con mitocondrias tubulares con respecto al control (Figura 35 C). El hecho de que la sobreexpresión de dos fosfatasas distintas funcionase para restablecer parcialmente la morfología mitocondrial, nos hizo buscar más quinasas candidatas que pudiesen estar activando a Drp1 en excitotoxicidad. Tras analizar la bibliografía llegamos a las enzimas ROCK.

En hiperglucemia se ha descrito la activación de las proteínas ROCK1 promoviendo la fosforilación y activación de Drp1 en la Serina 637 aumentando la fragmentación mitocondrial (Wang W, et al. 2012). En el sistema nervioso central se ha descrito que la isoforma ROCK1 es predominante en las células gliales mientras que ROCK2 es específica de neuronas (Hashimoto R, et al. 1999; Koch JC, et al. 2014). Se trabajó con dos inhibidores comerciales distintos de ROCK2, el Y-27632 (10  $\mu$ M) y el Fasudil (10  $\mu$ M). Ambos promovieron un aumento significativo de la fusión mitocondrial tanto en la situación control como tras el tratamiento con NMDA. Tras comprobar que estos resultados eran los únicos vinculados a la fosforilación de Drp1 que habían dado resultados positivos, se decidió indagar un poco más. Se transfectaron las células con una variante WT de ROCK2 y se obtuvieron los efectos esperados, un aumento significativo con respecto al control de la fragmentación mitocondrial tanto en la situación no tratada como en la tratada con NMDA. Por otro lado, las neuronas se transfectaron también con un ShROCK2 pensando que conseguiríamos reproducir el resultado de los inhibidores, pero no fue así. Estas neuronas KD para ROCK2 se fragmentaban igual que el control tras el tratamiento y presentaban un cierto aumento no significativo en la situación sin tratar (Figura 35 D). Una explicación sería que, en realidad, ROCK1 podría estar actuando en la fosforilación de Drp1 a pesar de que la isoforma ROCK2 sea la predominante en neuronas. Esto explicaría el efecto protector que se ha obtenido con los dos inhibidores y no se ha observado con el ShROCK2. También se tiene que tener en cuenta que las quinasas ROCK fosforilan distintos componentes del citoesqueleto alterando, indirectamente, la morfología mitocondrial (Amano M, et al. 2003). Sobre esto se hablará en el siguiente apartado. Puesto en común y teniendo en cuenta que haría falta seguir indagando en las especificaciones, podríamos concluir las quinasas ROCK podrían ser potenciales activadores directos o indirectos de Drp1 en excitotoxicidad.

Teniendo en cuenta que en ninguno de los casos anteriormente mencionados se ha obtenido una recuperación total de la morfología mitocondrial, se decidió probar la combinación de dos de los inhibidores utilizados, el de la enzima nNOS (7-Nitroindazole) y el de ROCK2 (Y-27632), para comprobar si la acción sumada de ambas era suficiente para recuperar llegar a la situación control de más de un 60 % de neuronas con mitocondrias tubulares (Figura 35 E). La diferencia

---

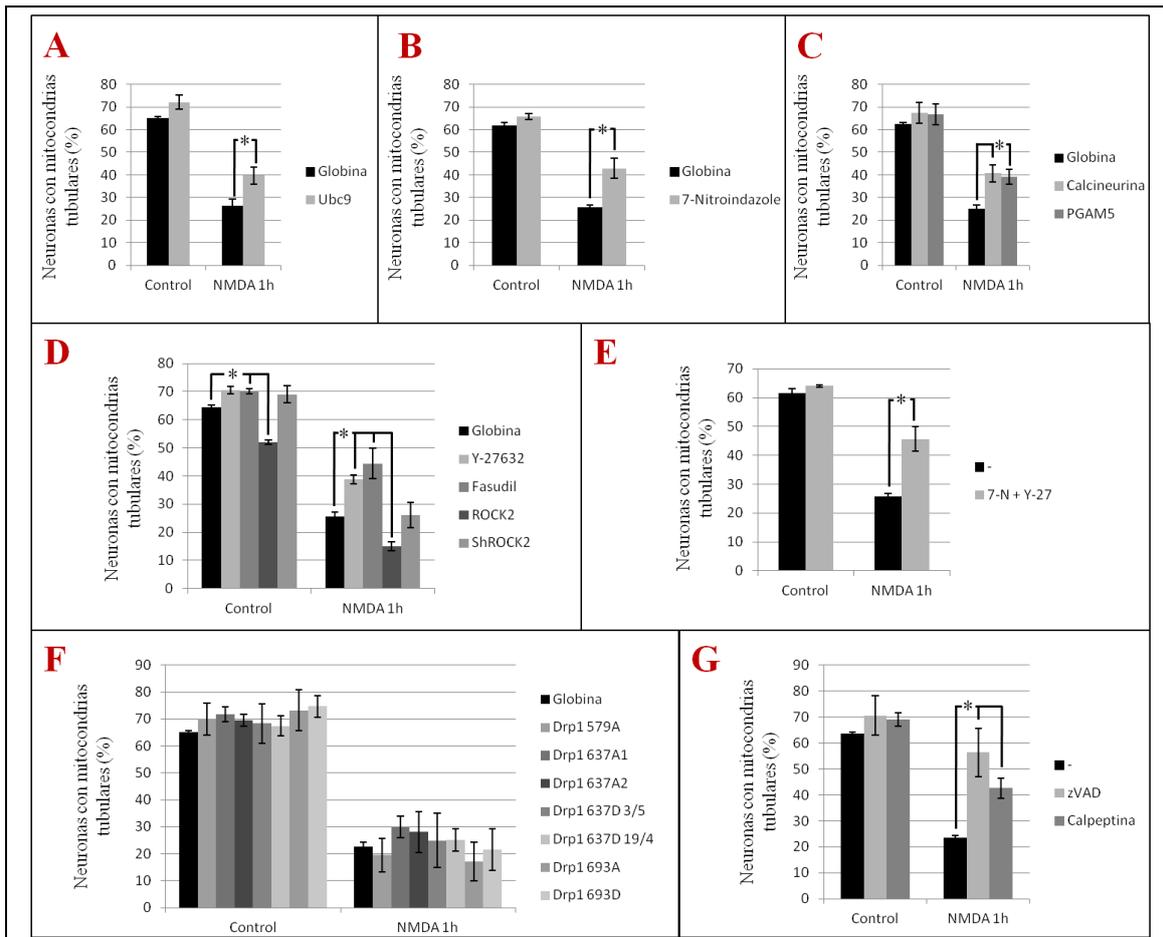
en comparación con la situación donde no se aplicaron los inhibidores y después de tratar 1 hora con NMDA (30  $\mu$ M) fue significativa pero el porcentaje era el mismo que ambos inhibidores aplicados por separado.

A raíz de todos los resultados anteriores se decidió recopilar toda una serie de variantes mutadas del dominio GTPasa de la proteína Drp1 utilizados y publicados por muchos laboratorios para comprobar si específicamente podíamos encontrar uno que evitara la fragmentación. Tras el tratamiento con NMDA (30  $\mu$ M) durante una hora, no se obtuvo ningún resultado prometedor (**Figura 35 F**). Ninguna variante mutada protegía, tampoco las cuatro utilizadas para la Serina 637, el residuo donde actúa ROCK1. Este resultado apoya la hipótesis de que las quinasas ROCK podrían estar actuando sobre Drp1 de forma directa en un residuo todavía no descrito o de forma indirecta a través del citoesqueleto.

Por último, probamos por separado la Calpeptina (10  $\mu$ M), un inhibidor de la proteasa Calpaína y el zVAD (20  $\mu$ M), un inhibidor de las caspasas, para comprobar su eficiencia en el bloqueo de la progresión de la muerte celular. Ambas proteasas, la Calpaína y las caspasas, se han descrito que pueden ser activadas en excitotoxicidad (Li M, et al. 2001; Okamoto S-I, et al. 2002; Tang X, et al. 2005; Smith PD, et al. 2006). Las neuronas se pre-trataron con cada uno de los inhibidores, por separado, durante 45 minutos antes de ser tratados con NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora. Los resultados mostraron una recuperación significativa del porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares (**Figura 35 G**). En el caso de la utilización del zVAD la protección ante la fragmentación mitocondrial era más alta que todos los inhibidores anteriores que se habían utilizado. Se ha descrito que las caspasas pueden ser activadas y penetrar en el espacio intermembranal de las mitocondrias después de que se haya formado el PTP interrumpiendo la cadena transportadora de electrones y el buen funcionamiento de las mitocondrias (Ricci JE, et al. 2004). La apoptosis es un proceso que cursa en varias horas, mientras que nosotros trabajamos a tiempos cortos, 1 hora de tratamiento. El motivo por el que el zVAD podría estar evitando la fragmentación mitocondrial en este contexto lo desconocemos, pero nos permitirá seguir trabajando en estos aspectos.

A continuación nos planteamos corroborar mejor los datos obtenidos al utilizar los inhibidores de ROCK2, teniendo en cuenta que la sobreexpresión de la forma mutada de Drp1 en la Serina 637 no dio resultados esperados. Se están desarrollando experimentos de aislamiento mitocondrial y co-inmunoprecipitación para detectar el reclutamiento de Drp1 a las mitocondrias y el aumento de fosforilación de Drp1, respectivamente. Para las co-inmunoprecipitaciones se utiliza un anticuerpo primario específico de la forma fosforilada en la Serina 637 de Drp1. Estos resultados son muy preliminares y deben ser corroborados varias veces afinando también la técnica de aislamiento mitocondrial y la co-inmunoprecipitación.

Todo en común demuestra que Drp1 es una proteína que debe ser regulada con suma delicadeza porque la fragmentación mitocondrial y consecuente mitofagia o apoptosis dependen de ello. Además de las vías de activación de Drp1 comentadas hasta el momento, se está indagando mucho en la implicación del citoesqueleto en el proceso de fisión mitocondrial.



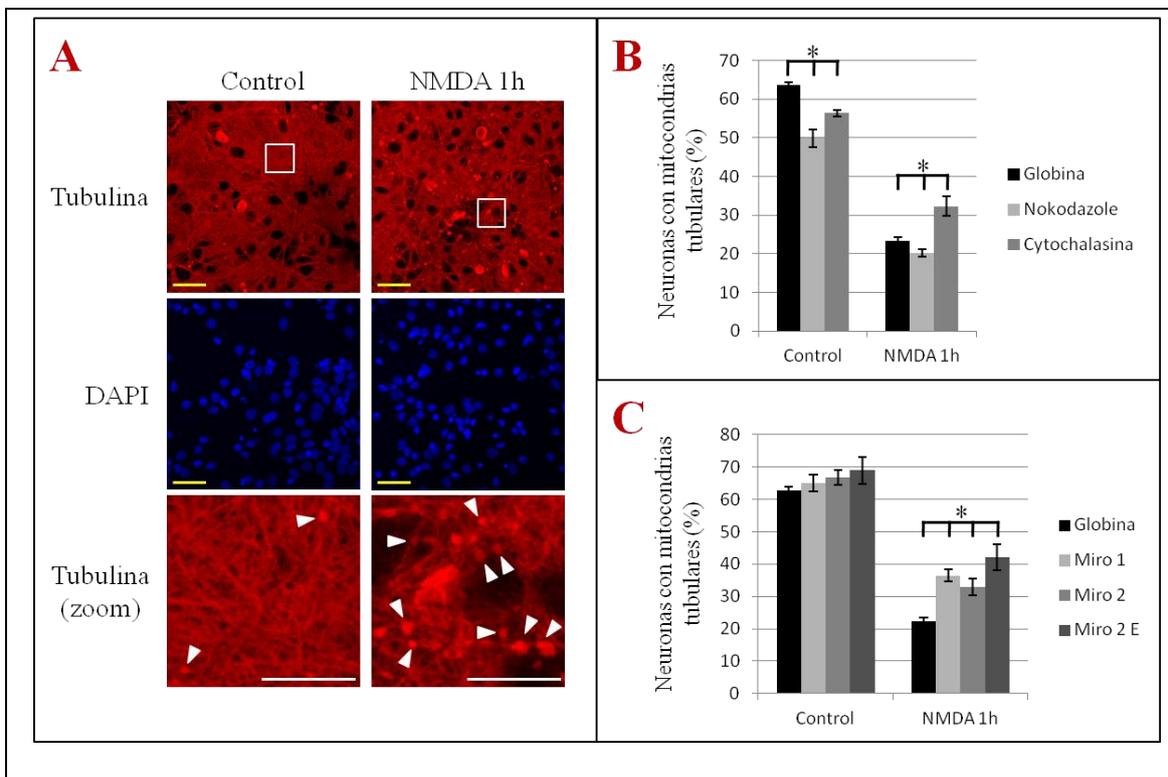
**Figura 35.** Resultados positivos en la inhibición de la activación de Drp1 en excitotoxicidad. Todos los inhibidores se aplicaron al cultivo 30 minutos antes de empezar el tratamiento con NMDA. Neuronas transfectadas con mitoRFP. Se ha comprobado el efecto del NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora sobre la morfología mitocondrial. **A)** Neuronas transfectadas con un dominante negativo de Ubc9, enzima E2 que inhibe la SUMOilación. **B)** Morfología mitocondrial en neuronas pre-tratadas con 7-Nitroindazole (7-N), un inhibidor de la NO sintasa (5  $\mu$ M). **C)** Sobreexpresión de las fosfatasas Calcineurina y PGAM5. **D)** Aplicación de los inhibidores de ROCK2 Y-27632 (10  $\mu$ M) y Fasudil (10  $\mu$ M). También se transfectaron los cultivos con una forma WT de ROCK2 y un ShROCK2. **E)** Combinación de los inhibidores (7-N) e Y-27632 (Y-27). **F)** Neuronas transfectadas con toda una serie de variantes mutadas del dominio GTPasa de Drp1. La morfología mitocondrial se cuantificó con una n = 3 – 5 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas. **G)** Neuronas tratadas durante 1 hora con NMDA (30  $\mu$ M) después de ser pre-tratadas durante 45 minutos con Calpeptina (10  $\mu$ M) o zVAD (20  $\mu$ M). La morfología mitocondrial se cuantificó con una n = 3 – 6 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas.

### *El papel del citoesqueleto en el reclutamiento de Drp1 a las mitocondrias*

En neuronas, las mitocondrias deben desplazarse largas distancias para cubrir las demandas de energía y de tamponamiento de calcio que la célula requiere. Por estos motivos, una neurona madura presenta sus mitocondrias tubulares perfectamente repartidas por toda su extensión y el 65-80 % de ellas son estacionarias, se mueven muy poco (Kang JS, et al. 2008). Se ha descrito que el citoesqueleto de actina parece participar en el proceso de fisión junto al retículo endoplasmático (ER) y podría promover el reclutamiento de Drp1 a la mitocondria (De Vos KJ,

et al. 2005). El primer paso fue valorar la morfología que presenta el citoesqueleto de tubulina en un cultivo de neuronas después de ser tratadas durante 1 hora con NMDA (30  $\mu$ M). El estudio lo realizamos mediante una inmunofluorescencia contra tubulina (**Figura 36 A**). Tal como puede observarse en los recuadros ampliados (zoom) tras el tratamiento, las neuronas parecen presentar unos ovillos o apelonamiento donde se detecta tubulina. Para testar como afecta el citoesqueleto a la morfología mitocondrial, utilizamos inhibidores de la polimerización de la tubulina (Nocodazole, 10  $\mu$ M) y la actina (Cytochalasina, 1  $\mu$ M). Las neuronas fueron transfectadas con mitoRFP y tratadas durante 1 hora con NMDA (30  $\mu$ M). La inhibición de la polimerización de la tubulina incrementaba la fisión mitocondrial mientras que al inhibir el de la actina se ha observado una ligera protección ante la fragmentación (**Figura 36 B**) que corrobora las observaciones donde la actina se ha descrito que puede promover la fisión (De Vos KJ, et al. 2005).

La desregulación de los niveles de calcio que acaecen en excitotoxicidad debido a la abertura del receptor NMDA favorecen la disrupción del transporte mitocondrial a lo largo de la neurona. Milton es una molécula adaptadora vinculada al movimiento de las mitocondrias actuando de puente entre estas y las proteínas motoras dineína/quinesina. Concretamente interaccionan con la GTPasa Miro de la membrana externa de las mitocondrias (Stowers RS, et al. 2002). Miro contiene dos dominios GTPasa separados y también dos dominios de unión al  $Ca^{2+}$ . Las mitocondrias se desplazan por la célula hasta los lugares donde hay aumentos en la concentración de calcio. Al llegar a la zona, Miro une calcio y se separa del complejo Milton/Proteína motora liberando la mitocondria del citoesqueleto o frenándola para que pueda tamponar calcio (Sheng Z-H, 2014). Se sobrexpresó Miro 1, 2 y una versión mutada de Miro 2 sin la capacidad de unir iones  $Ca^{2+}$  (Miro 2 E208K/E328K). Se analizó el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares y se vió que era suficiente para proteger ligeramente la morfología mitocondrial ante 1 hora de tratamiento con NDMA (30  $\mu$ M) (**Figura 36 C**).

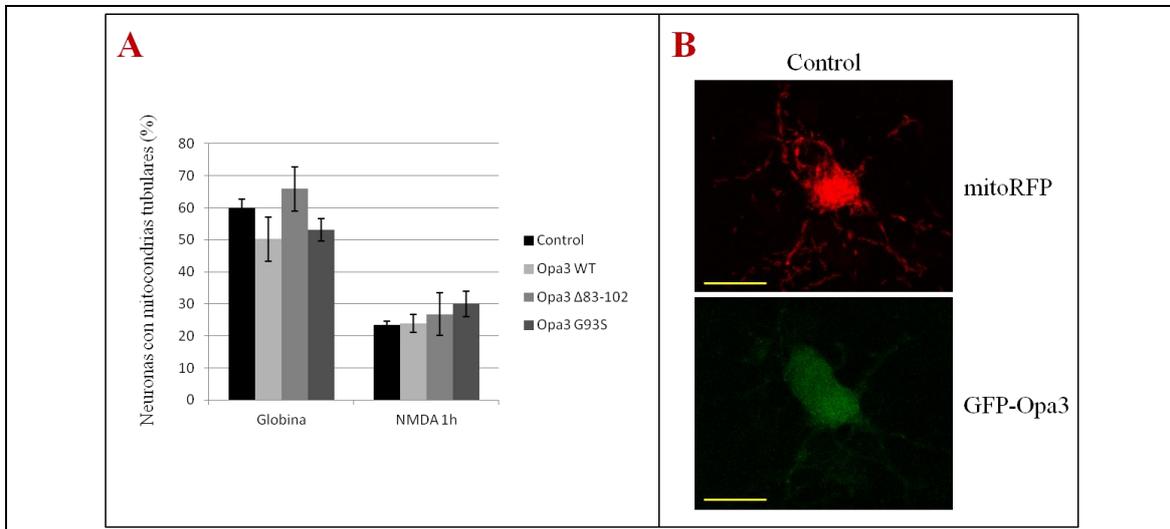


**Figura 36.** El citoesqueleto juega un papel importante en el mantenimiento de la morfología mitocondrial. **A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra la proteína tubulina en neuronas control o sometidas a 1 hora de tratamiento con NMDA (30  $\mu$ M). Los núcleos celulares han sido marcados con DAPI. Las flechas blancas señalan los ovillos de tubulina. *Barra de escala amarilla = 60  $\mu$ m. Barra de escala blanca = 30  $\mu$ m.* **B)** Neuronas transfectadas con mitoRFP y sometidas a NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora. Las neuronas se pre-cultivaron durante 45 minutos con el inhibidor de la polimerización de la tubulina (Nocodazole, 10  $\mu$ M) o el de la actina (Cytochalasina, 1  $\mu$ M). La morfología mitocondrial se cuantificó con una n = 3 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas. **C)** Neuronas transfectadas con Miro1, Miro 2 y Miro 2 E208K/E328K (Miro E). Porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares obtenido de una n = 3 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas.

Estos resultados indican que la forma mutada de Miro2 incapaz de unir calcio y que, por tanto, no puede promover la separación de las mitocondrias del citoesqueleto en una zona con concentraciones elevadas de calcio, protege ante la fragmentación mitocondrial del mismo modo que la sobreexpresión de las dos isoformas de Miro. Estas observaciones podrían explicarse con el hecho de que mantener las mitocondrias unidas a los microtúbulos podría estar facilitando el proceso de fusión mitocondrial al mantener las mitocondrias en movimiento.

*Otras posibles vías de fisión mitocondrial independientes de Drp1*

A raíz del amplio estudio que elaboramos para detectar la activación de Drp1 en excitotoxicidad, nos planteamos también probar otra vía de fisión mitocondrial independiente de Drp1 que empieza a conocerse. En este nuevo contexto se ha implicado a Opa3 una proteína de la membrana externa de las mitocondrias. En 2010 se describió por primera vez su función directa en la promoción de la fisión mitocondrial en células HeLa y COS-7 (Ryu SW, et al. 2010). De los autores de este trabajo adquirimos varias construcciones: La forma WT de Opa3 para poderla sobreexpresar, la forma mutada Opa3 G93S descrita en pacientes y otra forma mutada donde se ha eliminado la región hidrofóbica que corresponde a los aa 83-102 de Opa3. La primera forma mutada debería promover, según los autores del trabajo, un incremento en la fragmentación comparado con el incremento que genera la sola sobreexpresión de la forma WT de Opa3 y la segunda forma mutada con la región eliminada debería evitar dicha fragmentación. Se realizaron los experimentos tratando las neuronas con NMDA 30  $\mu$ M durante 1 hora y parece que no se distingue ningún cambio entre cada una de las construcciones (**Figura 37 A, B**).



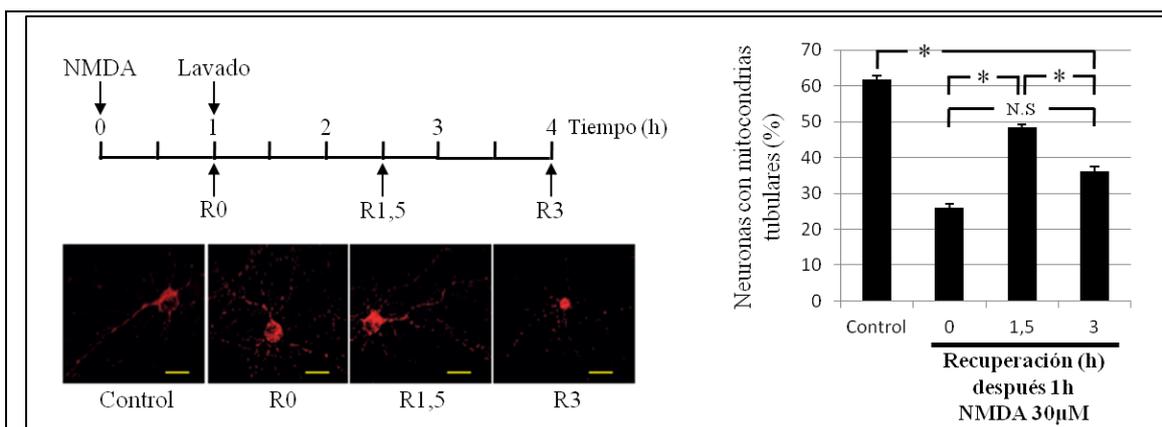
---

**Figura 37.** Opa3 no promueve la fragmentación mitocondrial en excitotoxicidad. **A)** Neuronas transfectadas con las distintas construcciones de Opa3 (Opa3 WT, Opa3  $\Delta$ 83-102 y Opa3 G93S) y el marcador mitoRFP para analizar la morfología mitocondrial. Cuantificación basada en una n = 3 experimentos independientes. **B)** Imagen de microscopía confocal mostrando la expresión de GFP por parte del plásmido Opa3 WT. Mitocondrias marcadas con mitoRFP. *Barra de escala = 20  $\mu$ m.*

Los resultados con Opa3 nos llevan a pensar que esta proteína podría no jugar un papel destacado en la fisión mitocondrial de neuronas sometidas a excitotoxicidad.

## LA FASE TARDÍA DE LA FRAGMENTACIÓN MITOCONDRIAL ES IRREVERSIBLE

La activación y reclutamiento de Drp1 parece explicar el motivo de la fase temprana de la fragmentación mitocondrial en excitotoxicidad. De todos modos esto no aclara porque a partir de la cuarta hora hay una segunda fase de fisión. Anteriormente se ha descrito que el glutamato y el óxido nítrico promueven la fragmentación mitocondrial y este efecto puede ser revertido una vez el estímulo a cesado (Rintoul GL, et al. 2003; Barsoum MJ, et al. 2006). Por este motivo decidimos probar si en nuestro sistema también se podía observar el efecto revertido que causa la excitotoxicidad sobre la morfología mitocondrial. Igual que hasta el momento, se ha trabajado tratando los cultivos primarios de neuronas con NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora pero después de esta hora de tratamiento se retiraba el medio del cultivo, se lavaba y se añadía medio fresco sin NMDA. A partir de aquí se miró qué ocurría tras 1,5 y 3 horas de recuperación. Observamos que la morfología mitocondrial se recuperaba después de 90 minutos de recuperación (1,5 horas) pero el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares descendía de nuevo después de 180 minutos (3 horas) de recuperación (**Figura 38**). Esta recaída de la morfología mitocondrial ocurre tras 1 hora de tratamiento y 3 de recuperación, es decir 4 horas en total, coincidiendo con la fase tardía de fragmentación mitocondrial (**Figura 38 B**).

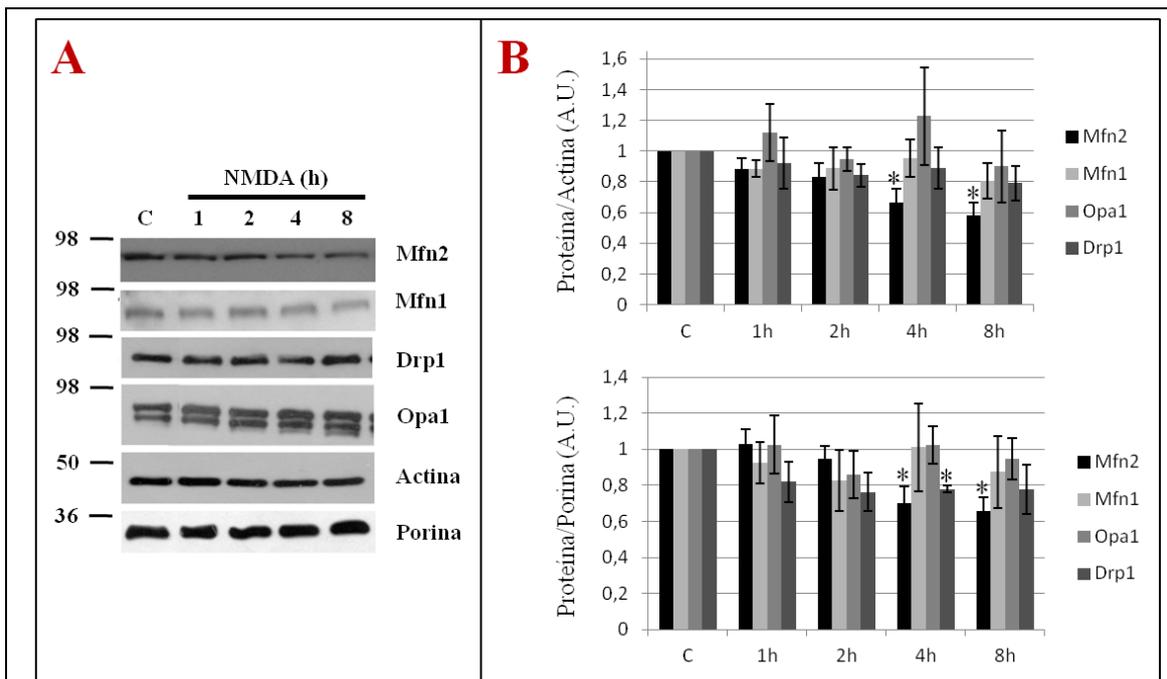


**Figura 38.** La excitotoxicidad promueve una fase tardía e irreversible de la fragmentación mitocondrial. Esquema del protocolo de recuperación, imágenes representativas de cada tiempo y análisis de la fragmentación mitocondrial secundaria después del lavado del NMDA. Después de 48 horas de haber transfectado las neuronas con mitoRFP, fueron estimuladas con NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora y este medio se lavó y cambió por medio fresco. La morfología mitocondrial se cuantificó con una  $n = 4-5$  experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. N.S. = no significativo. Barra de escala = 20  $\mu$ m.

### La expresión de Mfn2 se reduce bajo los efectos de la excitotoxicidad *in vitro* e *in vivo*

Tras obtener los resultados anteriores deliberamos que la fragmentación mitocondrial durante la fase tardía en excitotoxicidad podría depender de otro factor ya que Drp1 es reclutada durante la fase temprana (**Figura 33**).

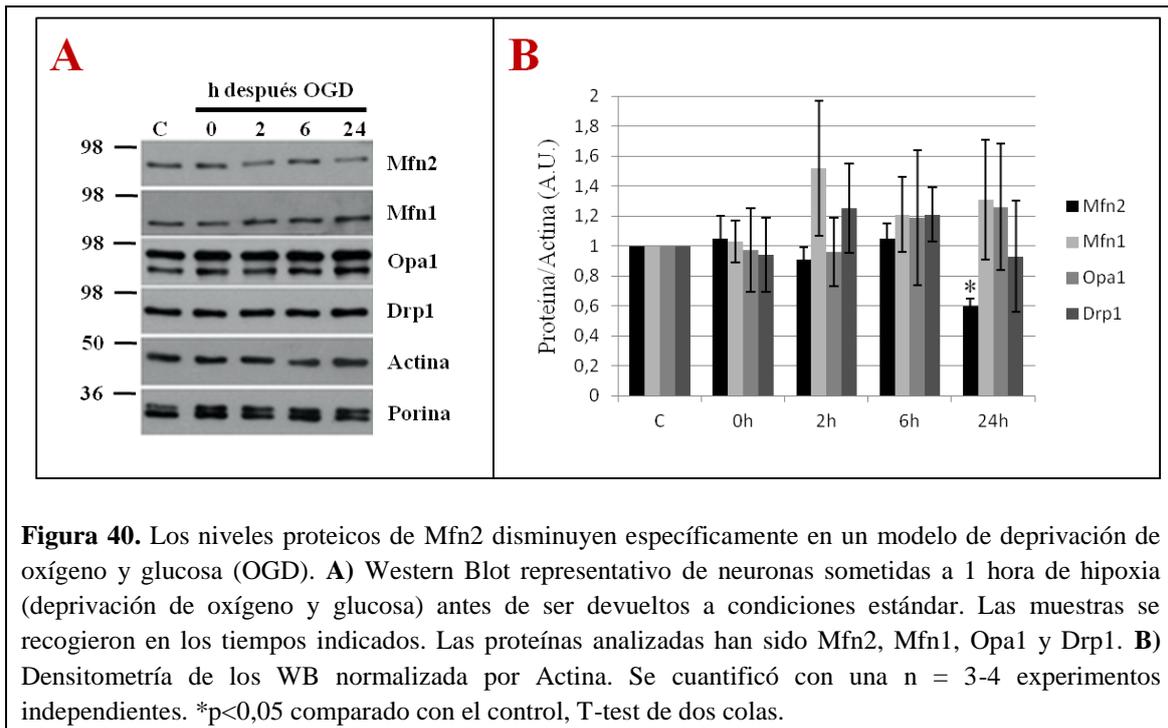
Son muchas las proteínas involucradas en la regulación de la dinámica mitocondrial y todavía se siguen describiendo de nuevas. De entre ellas, 4 son las que median activamente el proceso de fusión/fisión. Tras observar cómo la activación de Drp1 durante la excitotoxicidad promueve que las mitocondrias se fragmenten en una primera fase temprana, decidimos analizar las principales proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial para comprobar sus niveles y comprobar si alguna podría estar ligada a la fase tardía de fragmentación. Analizamos las Mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y 2, respectivamente), Opa1 y también Drp1. Los cultivos primarios de neuronas fueron sometidos a una concentración moderadamente tóxica (30  $\mu$ M) de NMDA durante 1, 2, 4 u 8 horas. La concentración de las cuatro proteínas mencionadas fueron analizadas por Western Blot. Durante las dos primeras horas tras el tratamiento con NMDA no se observaron cambios significativos en ninguna de las proteínas de fusión ni de fisión. Sin embargo, a partir de la cuarta hora se detectó una reducción del 40 % en la proteína de fusión Mfn2 sin obtenerse cambios en las demás analizadas. Dicha caída continuó durante la octava hora tras el inicio del tratamiento. Cabe destacar que Drp1, la principal proteína encargada de la fisión mitocondrial, sufre una ligera disminución tras la primera hora de tratamiento pero se estabiliza y no varía más a lo largo del tiempo. Sobre Mfn1 y Opa1 no se detecta ningún cambio significativo (**Figura 39 A**). Teniendo en cuenta la posibilidad que la reducción en los niveles proteicos pueda ser debida a un cambio en la masa total de las mitocondrias, el volumen fue normalizado tanto por actina como con la proteína mitocondrial porina, obteniendo resultados muy similares (**Figura 39 B**).



**Figura 39.** Los niveles de Mfn2 disminuyen en excitotoxicidad *in vitro*. Análisis de los resultados de Western Blot. **A)** Cultivos primarios de neuronas sometidas a NMDA (30  $\mu$ M) para los tiempos indicados. Se han analizado las proteínas de fusión Mfn1, Mfn2 y Opa1; así como la de fisión Drp1. **B)** Densitometría de la concentración de cada proteína normalizada tanto por Actina como por Porina. La densitometría se cuantificó con una n = 3 – 6 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas.

Para validar los resultados proteicos obtenidos, trabajamos con otro modelo *in vitro* de excitotoxicidad basado en la generación de un ambiente que simule el contexto fisiológico en el

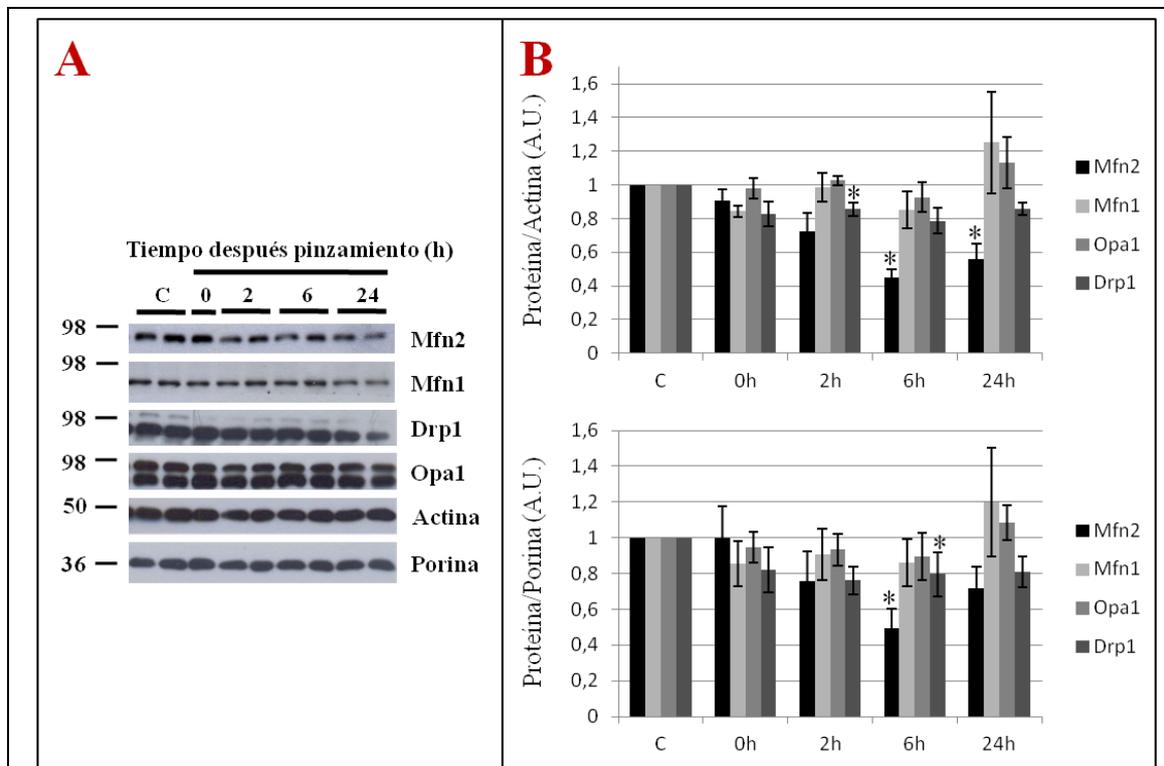
que se encuentran las neuronas tras una isquemia (Wahl A-S, et al. 2009). Es un modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD, *oxygen and glucose deprivation*). Se trabaja con un medio de cultivo sin glucosa y libre de oxígeno que se consigue con la utilización de una cámara de hipoxia donde se inyecta un 95% N<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> durante 5 minutos, se incuba 1 hora a 37 °C, asegurando que la cámara está bien sellada, y después se cogen muestras cada tiempo marcado después de substituir el medio de hipoxia con medio normal. Los resultados mostraron una reducción en los niveles proteicos de Mfn2 cuatro horas tras la reoxigenación. Igual que en el otro modelo *in vitro*, las demás proteínas de la maquinaria de fisión/fusión no disminúan sus niveles (**Figura 40 A, B**).



Tras observar que el efecto de la excitotoxicidad parecía afectar específicamente los niveles proteicos de Mfn2 en cultivos primarios de neuronas bajo un contexto de excitotoxicidad y en condiciones de hipoxia (*in vitro*), decidimos comprobar la relevancia fisiopatológica en un modelo *in vivo* puesto en práctica en el laboratorio del Dr. Julien Puyal. Nos enviaron extractos proteicos totales de corteza de ratas de 12 días de edad a las que provocaron un daño cerebral isquémico mediante una oclusión permanente de una arteria cerebral media combinado con un pinzamiento transitorio de 90 minutos de la arteria carótida común ipsilateral, este protocolo se conoce como MCAO (Vaslin A, et al. 2009). Durante un episodio isquémico se ha descrito que los niveles de glutamato se acumulan en las hendiduras sinápticas. A raíz de ello, los mecanismos de captación quedan deteriorados y/o se invierten (Camacho A. & Massieu L. 2006) induciendo una activación excesiva del receptor NMDA del glutamato (NMDAR) y la posterior muerte celular mediada por Ca<sup>2+</sup> (Arundine M. & Tymianski M. 2003).

Analizamos por Western Blot los cambios proteicos en las cuatro proteínas principales involucradas en la maquinaria de fusión/fisión en los extractos proteicos totales que nos enviaron. Los resultados obtenidos fueron muy similares al modelo *in vitro*. A la segunda hora, es decir, 3,5 horas después del inicio del daño isquémico, la proteína Mfn2 empieza a caer, alcanzando un 50 % de reducción seis horas después de restablecer el corriente sanguíneo en la

arteria carótida (**Figura 41 A, B**). Del mismo modo que observamos en los cultivos primarios de neuronas, los niveles de Drp1 parecen sufrir una ligera caída al inicio (20 %), 2 horas después de restablecer el flujo sanguíneo, que después se mantiene hasta las 24 horas. Por otro lado, Mfn1 y Opa1 no sufren ningún cambio palpable durante las 24 horas después de haber infringido un daño isquémico.



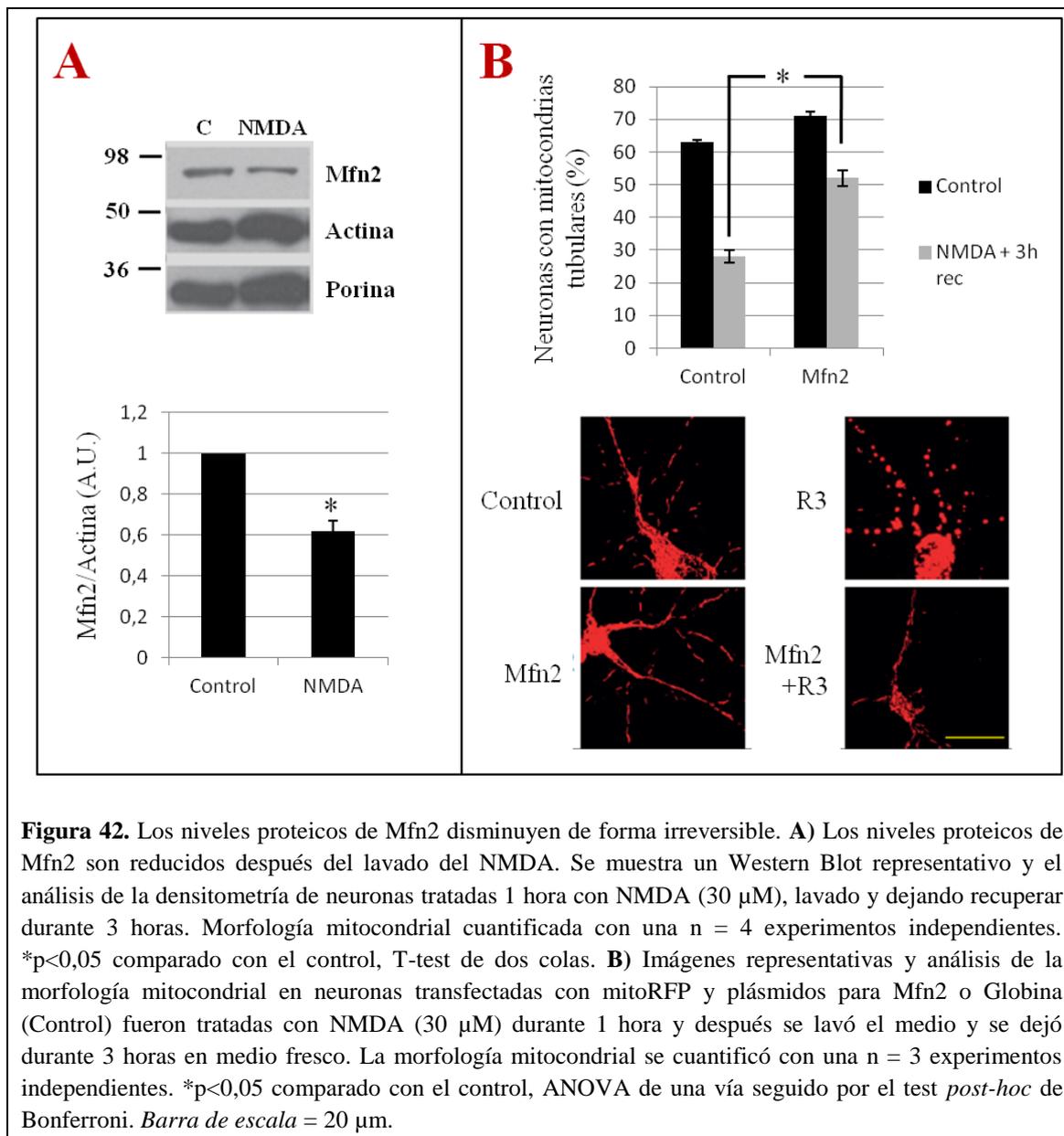
**Figura 41.** Caída de Mfn2 en un modelo *in vivo* de isquemia. **A)** Extractos totales de proteína de ratas de 12 días de edad a las que provocaron un daño cerebral isquémico mediante una oclusión permanente de una arteria cerebral media combinado con un pinzamiento transitorio de 90 minutos de la arteria carótida común ipsilateral. Las horas muestran el tiempo transcurrido después de finalizar el pinzamiento. **B)** Densitometría de las distintas proteínas normalizada por Actina y Porina. La densitometría se cuantificó con una n = 3 – 7 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, T-test de dos colas.

Estos resultados nos ayudan a afirmar que nuestro modelo *in vitro* de cultivos primarios de neuronas es una buena representación del efecto *in vivo* que causa la excitotoxicidad.

### Mfn2 interviene en una fase tardía e irreversible de la fragmentación mitocondrial

Al ver que la caída de los niveles proteicos de Mfn2 a la cuarta hora de tratamiento en los dos modelos *in vitro* (**Figura 39 y 40**) y en el *in vivo* (**Figura 41**) correlacionaba con la fase tardía e irreversible de la fragmentación mitocondrial en excitotoxicidad, se decidió hacer un WB para ver que ocurría con Mfn2 después de 1 hora de tratamiento con NMDA más 3 de recuperación sin NMDA. Se observó que el lavado del agonista no bloquea la consecuente reducción del 40 % de Mfn2 (**Figura 42 A**). En conclusión tras obtener estos resultados, razonamos que la disminución de los niveles proteicos de Mfn2 en excitotoxicidad interviene en la fase tardía de la fisión mitocondrial.

Tras ver la caída irreversible de Mfn2 se decidió comprobar qué ocurre al sobreexpresar Mfn2 en el mismo modelo experimental de recuperación. Lo que se observó fue que esta sobreexpresión de Mfn2 exógena era suficiente para bloquear la fase tardía de fragmentación mitocondrial después de lavar el NMDA (**Figura 42 B**).

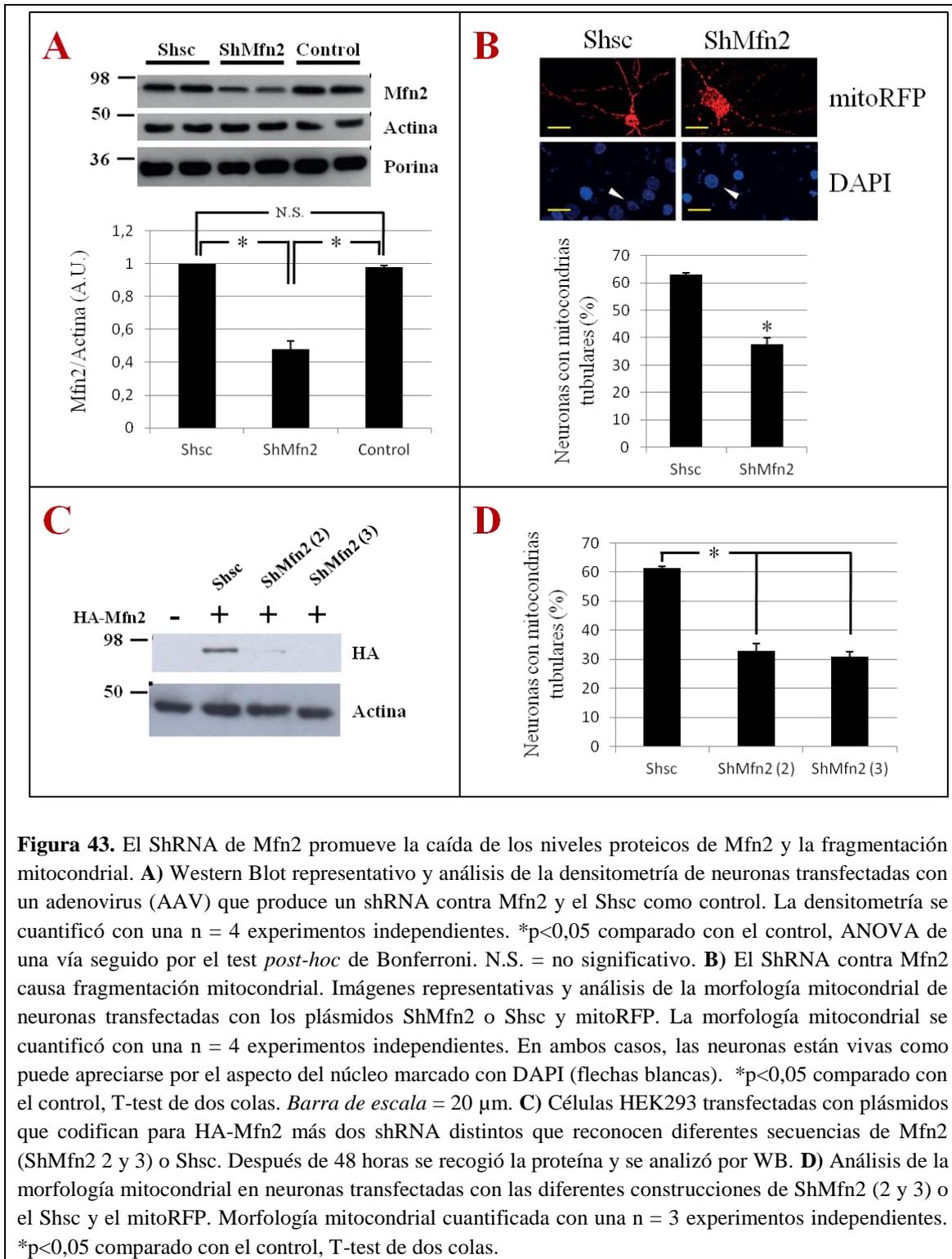


**Figura 42.** Los niveles proteicos de Mfn2 disminuyen de forma irreversible. **A)** Los niveles proteicos de Mfn2 son reducidos después del lavado del NMDA. Se muestra un Western Blot representativo y el análisis de la densitometría de neuronas tratadas 1 hora con NMDA (30 μM), lavado y dejando recuperar durante 3 horas. Morfología mitocondrial cuantificada con una n = 4 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas. **B)** Imágenes representativas y análisis de la morfología mitocondrial en neuronas transfectadas con mitoRFP y plásmidos para Mfn2 o Globina (Control) fueron tratadas con NMDA (30 μM) durante 1 hora y después se lavó el medio y se dejó durante 3 horas en medio fresco. La morfología mitocondrial se cuantificó con una n = 3 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. Barra de escala = 20 μm.

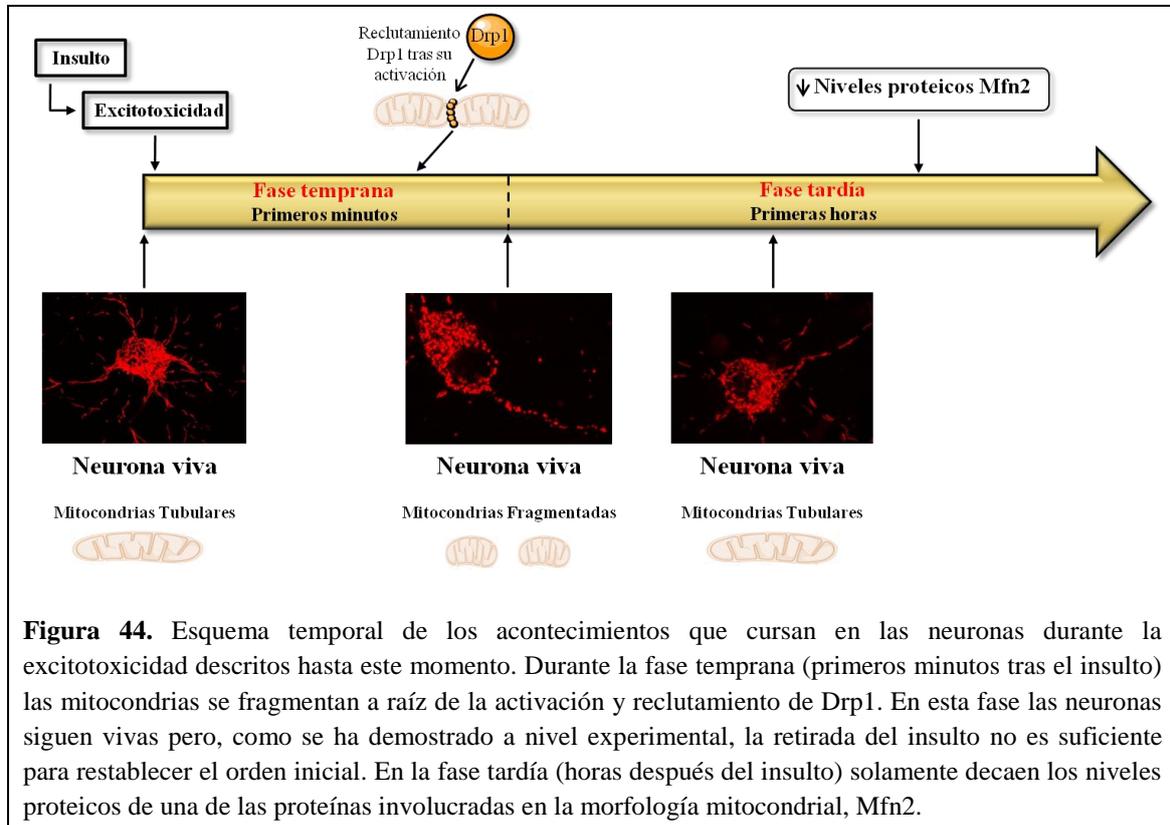
Para seguir estudiando lo que ocurre al disminuir los niveles proteicos de Mfn2, se trabajó con los vectores AAV *scrambled* (Shsc) como control y otro para disminuir los niveles de expresión de Mfn2 con un shRNA específico para su secuencia (ShMfn2). El Dr. Francesc Soriano produjo estos vectores y comprobó la eficiencia del ShMfn2 analizando mediante WB los niveles de proteína de Mfn2. Observó que estos disminuían alrededor del 50 % de forma muy parecida al efecto obtenido en la excitotoxicidad (**Figura 43 A**).

Después analizamos que este KD para Mfn2 era suficiente para promover la fragmentación mitocondrial (**Figura 43 B**). Para asegurarnos de que no fuese un efecto inespecífico, se crearon dos construcciones más llamadas ShMfn2 (2) y ShMfn2 (3). Se transfectaron células HEK293

con una construcción de Mfn2 que expresa el *tag* de la hemaglutinina (HA), HA-Mfn2, además de los dos shRNA que reconocen diferentes secuencias de Mfn2. Se hizo un Western Blot contra HA y se observó que ambos ShMfn2 reducían prácticamente a la totalidad los niveles proteicos de Mfn2 (**Figura 43 C**). Además, ambos promueven la fisión mitocondrial (**Figura 43 D**).



Todos estos resultados puestos en común indican que la excitotoxicidad promueve la fragmentación mitocondrial por dos mecanismos distintos. La primera fase cursa en poco tiempo (minutos) y depende de la activación y posterior reclutamiento de Drp1 a la mitocondria. La segunda fase más tardía (horas) dependería de la reducción de la expresión de Mfn2 que tiene lugar horas después del insulto y persiste independientemente de que se retire el estímulo excitotóxico (**Figura 44**).



**Figura 44.** Esquema temporal de los acontecimientos que cursan en las neuronas durante la excitotoxicidad descritos hasta este momento. Durante la fase temprana (primeros minutos tras el insulto) las mitocondrias se fragmentan a raíz de la activación y reclutamiento de Drp1. En esta fase las neuronas siguen vivas pero, como se ha demostrado a nivel experimental, la retirada del insulto no es suficiente para restablecer el orden inicial. En la fase tardía (horas después del insulto) solamente decaen los niveles proteicos de una de las proteínas involucradas en la morfología mitocondrial, Mfn2.

---

## MFN2 REGULA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LAS MITOCONDRIAS EN EXCITOTOXICIDAD

### Una menor expresión de Mfn2 causa disfunciones en las mitocondrias

Algunas funciones muy importantes de Mfn2 que no comparte con Mfn1 son, por ejemplo, la activación del metabolismo oxidativo mitocondrial o promover la unión de las mitocondrias con el retículo endoplasmático regulando así la homeóstasis del calcio (Bach D, et al. 2003; Pich S, et al. 2005; Baloh RH, et al. 2007, de Brito OM & Scorrano L, 2008a). La excitotoxicidad genera dos eventos clave, la alteración de la homeóstasis del calcio y disfunciones a nivel mitocondrial. En base a este principio nos interesamos por saber qué les ocurre a las mitocondrias a nivel funcional en una situación con niveles disminuidos de Mfn2.

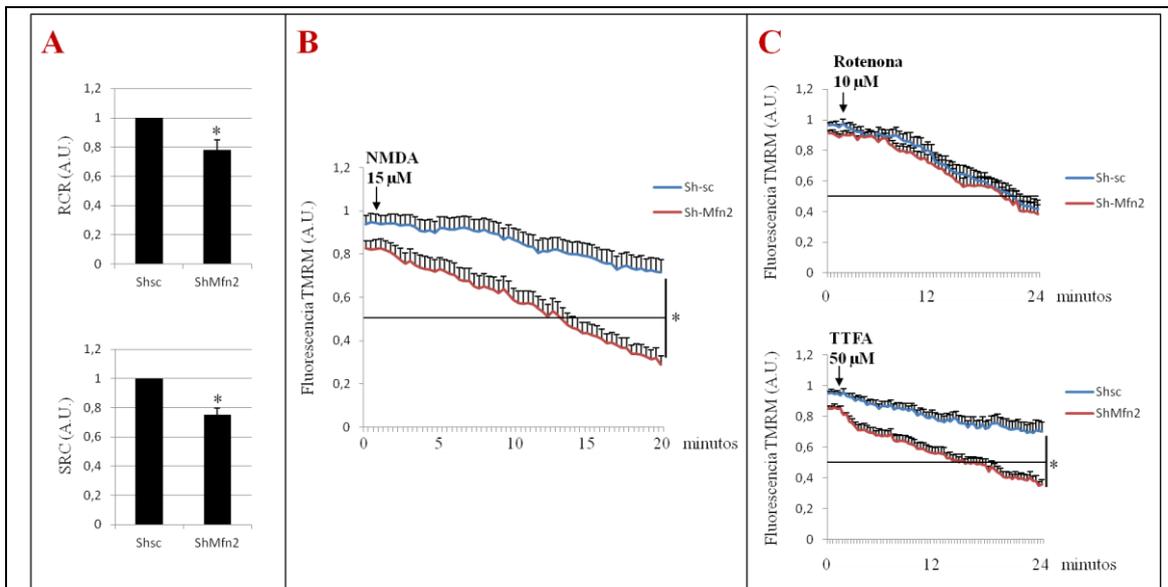
En primer lugar nos planteamos analizar la capacidad respiratoria de las mitocondrias de neuronas con menos niveles de Mfn2. Para ello colaboramos con el laboratorio del Dr. Antonio Zorzano, profesor de la Universidad de Barcelona (UB) e investigador del Instituto de Investigación Biomédica (IRB). A partir de nuestros cultivos primarios de neuronas, el Dr. Juan Pablo Muñoz realizó experimentos de respirometría utilizando el equipo *SeaHorse* XF24 para medir el consumo de oxígeno en las células. Los resultados que obtuvimos reflejaron una caída tanto del ratio de control respiratorio (RCR, por sus siglas en inglés) como de la capacidad respiratoria disponible (SRC, por sus siglas en inglés) en neuronas KD para Mfn2 (**Figura 45 A**). El RCR es un parámetro muy bueno para medir las funciones de las mitocondrias, concretamente mide la capacidad para crear ATP. Un valor elevado de RCR indica una buena funcionalidad mientras que valores bajos apuntan a algún problema. Por otro lado, el SRC es un parámetro para utilizar en tipos celulares que consumen mucho ATP, como las neuronas y el músculo. Mide la disponibilidad de sustratos y el transporte electrónico en respuesta a un aumento de la demanda de energía. Unos valores de SRC bajos denotan disfunciones mitocondriales (Brand MD & Nicholls DG, 2011).

A parte de la capacidad respiratoria medimos los niveles del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en neuronas transfectadas con el shRNA contra Mfn2 (ShMfn2) o el *scrambled* (Shsc). Se trabajó con la sonda TMRM que mide específicamente la señal del  $\Delta\Psi_m$  y se utilizó el microscopio confocal adaptado a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> para poder hacer *live cell imaging*. El cultivo se trató con NMDA (15  $\mu$ M) durante 18 minutos después de 2 minutos de lectura control. Se tomó una imagen cada 20 segundos. Se observó que las mitocondrias de las neuronas KD para Mfn2 presentaban un 15 % menos de  $\Delta\Psi_m$  que los controles en el momento antes de iniciar el tratamiento. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos en distintos tipos celulares (Bach D, et al. 2003; Soriano FX, et al. 2006a). Además, se vió que dosis sub-tóxicas de NMDA eran suficientes para promover una caída mucho más pronunciada del  $\Delta\Psi_m$  en neuronas KD para Mfn2 en comparación con el control (Shsc) (**Figura 45 B**).

El bombeo de protones (H<sup>+</sup>) desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal es lo que genera el  $\Delta\Psi_m$ . Se ha descrito que Mfn2 regula el metabolismo mitocondrial al interactuar con los complejos de la cadena respiratoria pero no se conoce el mecanismo preciso (Bach D, et al. 2003; Pich S, et al. 2005; Segales J, et al. 2013). El complejo I o NADH deshidrogenasa capta los electrones del NADH y los transfiere a un transportador liposoluble denominado ubiquinona (Q). El complejo II o Succinato deshidrogenasa pasa el FADH<sub>2</sub> a FAD y transfiere

los electrones también a la Q (Ow YL, et al. 2008). Para saber si Mfn2 altera alguno o ambos complejos donadores de electrones de la cadena respiratoria, se transfectaron neuronas con el Shsc o el ShMfn2 y analizamos el  $\Delta\Psi_m$  en el microscopio confocal. El cultivo se trató con Rotenona (10  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor del complejo I, o con TTFA (50  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor del complejo II. Al inhibir el complejo I se observó que la disminución del  $\Delta\Psi_m$  se daba a la misma velocidad tanto en el Shsc como en el ShMfn2 mientras que la inhibición del complejo II con el TTFA parece afectar de forma significativa la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  en las neuronas KD para Mfn2 (**Figura 45 C**). Estas observaciones parecen indicar que Mfn2 podría estar reduciendo la actividad de la cadena transportadora de electrones a través del complejo I.

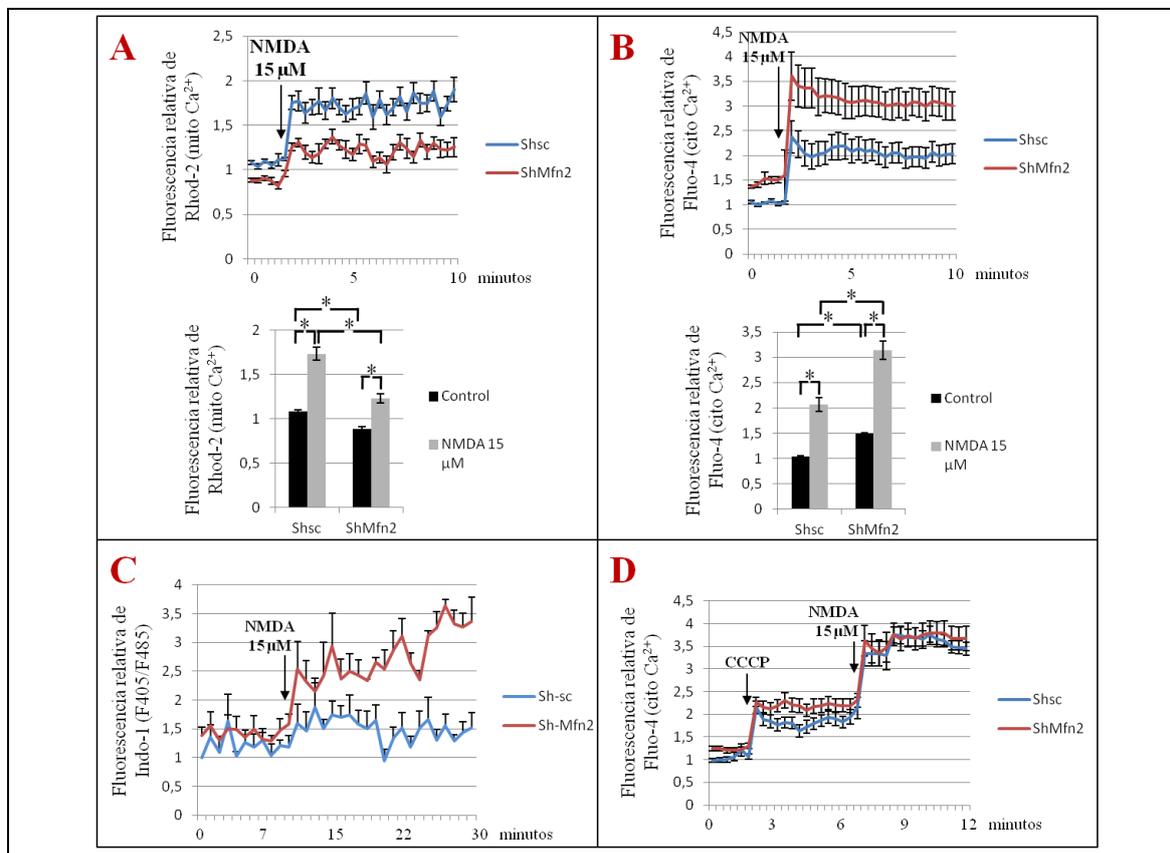
Estos resultados puestos en común demuestran que la reducción de los niveles de Mfn2 afectan las funciones básicas de las mitocondrias en neuronas.



**Figura 45.** Niveles inferiores de Mfn2 causan disfunciones mitocondriales. **A**) Se ha medido el ratio de control respiratorio (RCR, por sus siglas en inglés) y la capacidad respiratoria disponible (SRC, por sus siglas en inglés) en neuronas transfectadas con adenovirus (AAV) que expresan shRNA contra Mfn2 (ShMfn2) o el *scrambled* (Shsc). Las medidas se han cuantificado con una  $n = 6$  experimentos independientes.  $*p < 0,05$  comparado con el control, T-test de dos colas. **B**) Pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en neuronas transfectadas con el ShMfn2 o el Shsc y tratadas con NMDA (15  $\mu\text{M}$ ) (flecha). Los valores se han determinado midiendo la fluorescencia de la sonda TMRM. Los valores fueron normalizados con las neuronas no transfectadas de alrededor. La fluorescencia se ha medido en una  $n = 19-21$  neuronas en cinco experimentos independientes.  $*p < 0,05$  comparado con el control, T-test de dos colas. **C**) Análisis del  $\Delta\Psi_m$  ante el efecto de la Rotenona (10  $\mu\text{M}$ ) (flecha gráfico superior) y de TTFA (50  $\mu\text{M}$ ) (flecha gráfico inferior) un inhibidor del complejo I y del II de la cadena respiratoria, respectivamente. Las neuronas fueron transfectadas con el ShMfn2 o el Shsc. Los valores fueron normalizados con las neuronas no transfectadas de alrededor. La fluorescencia se ha medido en una  $n = 12$  neuronas en tres experimentos independientes.  $*p < 0,05$  comparado con el control, T-test de dos colas.

## La disminución de los niveles de Mfn2 afecta la homeóstasis del $\text{Ca}^{2+}$

Una de las muchas funciones relacionadas con las mitocondrias es el papel fundamental que juega a la hora de tamponar el aumento repentino de calcio durante la excitotoxicidad. Nos planteamos verificar mediante la técnica de *live cell imaging* con el microscopio confocal adaptado a 37 °C y 5 %  $\text{CO}_2$ , que en nuestro modelo de trabajo (neuronas KD para Mfn2) la homeostasis del calcio, es decir, la capacidad de las mitocondrias de tamponar el calcio, se vería afectada. Para ello tratamos los cultivos con NMDA (15  $\mu\text{M}$ ) y las neuronas fueron transfectadas con ShMfn2 o Shsc. En primer lugar medimos las concentraciones de calcio mitocondrial utilizando la sonda Rhod-2. Bajo condiciones control (primeros minutos sin tratamiento) ya se detectó que las mitocondrias de las neuronas KD para Mfn2 contenían una ligera concentración menor de  $\text{Ca}^{2+}$  (9,9 +/- 3,52 %) en comparación con el Shsc (**Figura 46 A**). Además, la aplicación de NMDA producía un menor aumento en estas neuronas KD demostrando su poca capacidad para tamponar el calcio. La sonda Rhod-2 que localiza en las mitocondrias es sensible a los cambios de voltaje, por lo que un  $\Delta\Psi_m$  reducido puede comportar menos fluorescencia por parte de la sonda. Debido a ello, decidimos analizar también el calcio citoplasmático. En contrapartida, al medir las concentraciones de calcio citoplasmático con la sonda Fluo-4 (**Figura 46 B**) e Indo-1 (**Figura 46 C**), detectamos que en las neuronas KD para Mfn2 los valores de calcio inicial eran más elevados en comparación con el control y estos se disparaban mucho más después del tratamiento. A diferencia de los anteriores, los experimentos con Indo-1 se realizaron por fluorimetría. El aumento de los niveles de calcio a nivel citoplasmático es debido a la reducida capacidad de las mitocondrias en poderlo tamponar ya que su despolarización con CCCP, que inhibe totalmente la capacidad de las mitocondrias en tamponar, produce el mismo aumento de calcio citoplasmático tras el tratamiento con NMDA (15  $\mu\text{M}$ ) tanto en las neuronas control (Shsc) como en las KD para Mfn2 (**Figura 46 D**).



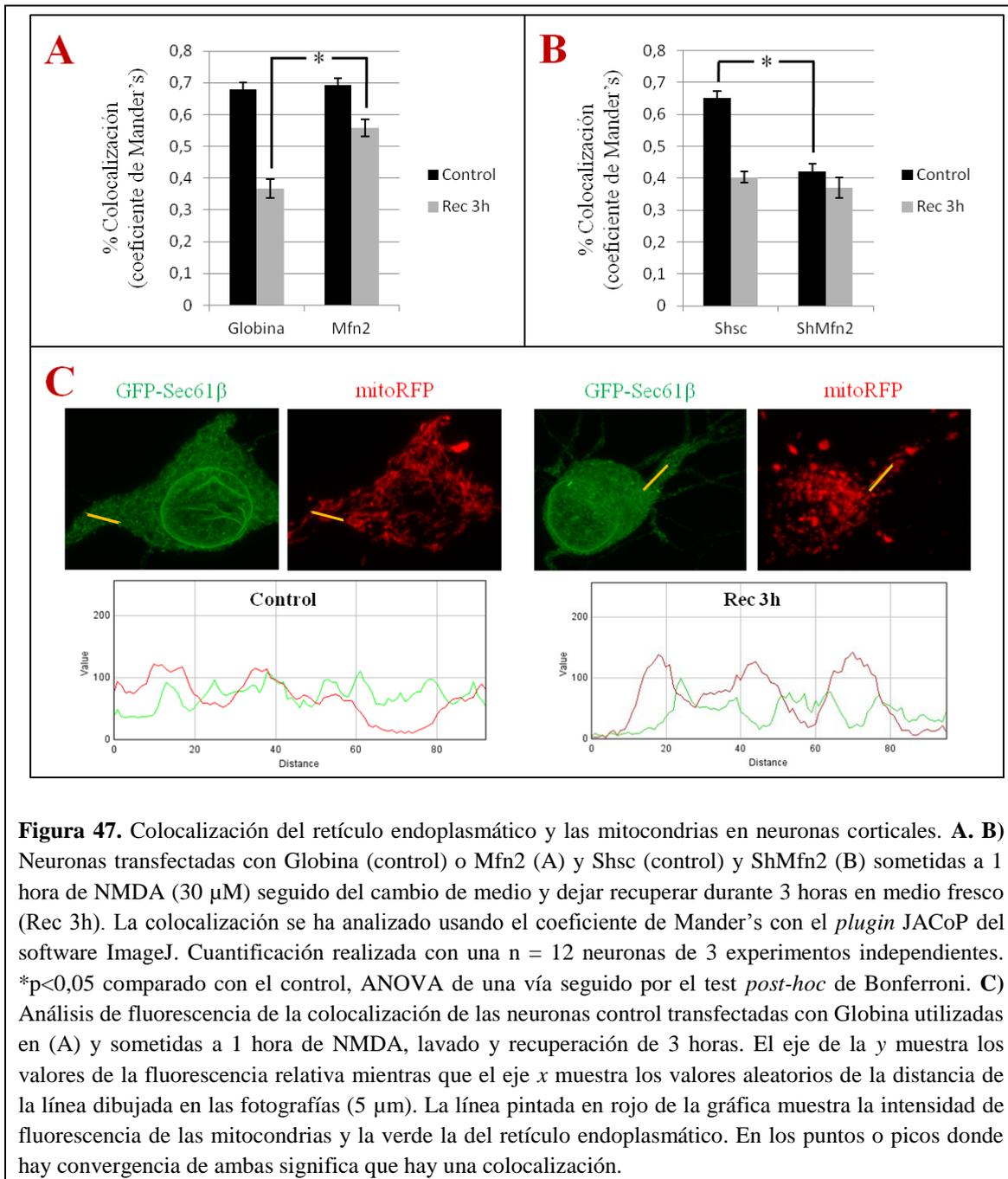
---

**Figura 46.** La reducción en los niveles de Mfn2 altera la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ . **A)** Determinación del calcio mitocondrial con Rhodamine-2 (Rhod-2) en neuronas corticales transfectadas con plásmidos que producen el Shsc o el ShMfn2 y tratadas con NMDA (15  $\mu\text{M}$ ) (flecha). Los valores se normalizaron con los de las neuronas no transfectadas de alrededor. El histograma muestra la media de señal de calcio antes y después del tratamiento. El análisis se ha realizado con una  $n = 20$  neuronas de 5 experimentos independientes.  $*p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. **B)** Determinación del calcio citoplasmático con la sonda Fluo-4 en neuronas transfectadas con los mismos plásmidos y sometidas al mismo tratamiento que en (A). Los valores se normalizaron con la señales de las neuronas no transfectadas de alrededor. El histograma muestra la media de señal de calcio antes y después del tratamiento. El análisis se ha realizado con una  $n = 16$  neuronas de 4 experimentos independientes.  $*p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. **C)** Determinación del calcio citoplasmático por fluorimetría con la sonda Indo-1 en neuronas corticales infectadas con adenovirus (AAV) que producen el Shsc o el ShMfn2 tratadas con NMDA (15  $\mu\text{M}$ ) (flecha) durante el tiempo marcado. Análisis realizado con una  $n = 3$  experimentos independientes. **D)** Medición del calcio intracelular con la sonda Fluo-4 en neuronas infectadas con AAV que producen Shsc o ShMfn2 después de que las mitocondrias hayan sido despolarizadas con CCCP (10  $\mu\text{M}$ ) y, después de esto, tratadas con NMDA (15  $\mu\text{M}$ ) en los tiempos indicados. Análisis realizado con una  $n = 16$  neuronas de 4 experimentos independientes.

En conclusión, estos datos apoyan la noción de que una reducción de Mfn2 produce un malfuncionamiento de las mitocondrias causando alteraciones en la homeóstasis del  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **Mfn2 es importante para el tamponamiento del $\text{Ca}^{2+}$ y la comunicación de las mitocondrias con el retículo endoplasmático**

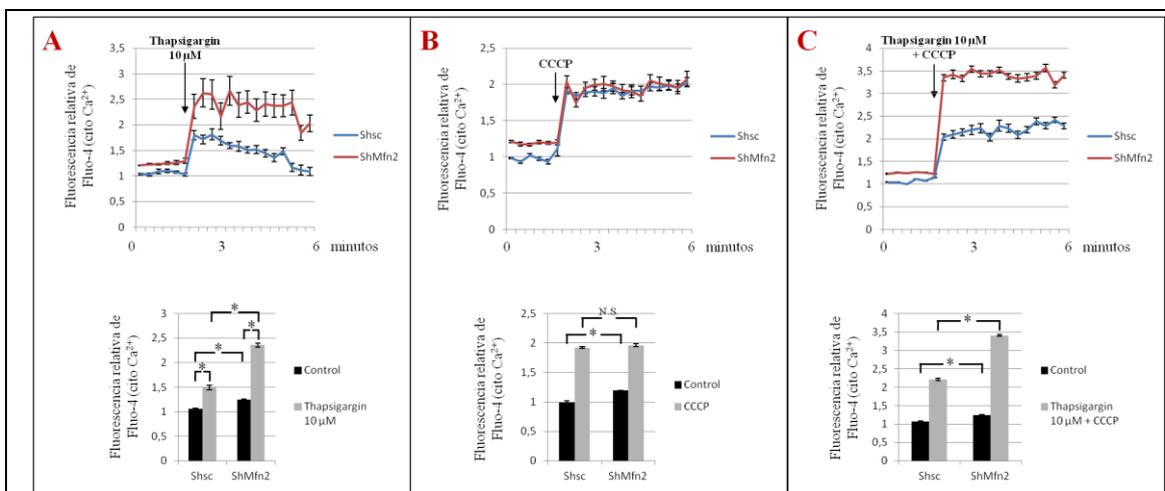
En las células eucariotas se ha descrito que los orgánulos, lejos de ser entes individuales o aislados, interaccionan entre ellos. De los distintos tipos de comunicaciones que se establecen, el efectuado entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático (ER) es de las más estudiadas y muy importante en la homeostasis del calcio, el metabolismo y transporte de lípidos, el metabolismo bioenergético, el estrés del retículo y el propio proceso de fisión mitocondrial (Hayashi T, et al. 2009). Las zonas de comunicación entre ambos orgánulos se llaman MAM. Mfn2 también se localiza en la membrana del ER y media la conexión con las mitocondrias (de Brito OM & Scorrano L, 2008). Nos planteamos comprobar si la reducción de los niveles proteicos de Mfn2 en excitotoxicidad podía promover la separación de ambos orgánulos y dificultar sus funciones en la captación del calcio, situación que empeoraría el contexto general de la neurona. Las neuronas fueron sometidas a 1 hora de tratamiento con NMDA (30  $\mu\text{M}$ ) más 3 horas de recuperación sin NMDA. Mediante microscopía confocal detectamos que el porcentaje de colocalización (basado en el coeficiente de Mander's) entre los orgánulos se veía disminuido en un 50 % tras el tratamiento. Dicho porcentaje podía ser parcialmente recuperado al sobreexpresar Mfn2 exógena (**Figura 47 A, C**). Por otro lado, neuronas KD para Mfn2 presentaban en la situación control, sin tratamiento, un 40 % menos de colocalización que el Shsc (**Figura 47 B**). Estos resultados indican una clara vinculación entre la correcta regulación de Mfn2 en el ensamblaje del ER con las mitocondrias.



**Figura 47.** Colocalización del retículo endoplasmático y las mitocondrias en neuronas corticales. **A. B)** Neuronas transfectadas con Globina (control) o Mfn2 (A) y Shsc (control) y ShMfn2 (B) sometidas a 1 hora de NMDA (30 μM) seguido del cambio de medio y dejar recuperar durante 3 horas en medio fresco (Rec 3h). La colocalización se ha analizado usando el coeficiente de Mander's con el *plugin* JACoP del software ImageJ. Cuantificación realizada con una n = 12 neuronas de 3 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. **C)** Análisis de fluorescencia de la colocalización de las neuronas control transfectadas con Globina utilizadas en (A) y sometidas a 1 hora de NMDA, lavado y recuperación de 3 horas. El eje de la y muestra los valores de la fluorescencia relativa mientras que el eje x muestra los valores aleatorios de la distancia de la línea dibujada en las fotografías (5 μm). La línea pintada en rojo de la gráfica muestra la intensidad de fluorescencia de las mitocondrias y la verde la del retículo endoplasmático. En los puntos o picos donde hay convergencia de ambas significa que hay una colocalización.

Si ambos orgánulos tienen dificultades para interactuar durante la excitotoxicidad por la caída de los niveles proteicos de Mfn2, el tamponamiento del calcio se verá gravemente perjudicado. La captación de calcio por parte de la mitocondria estimula la actividad del ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP además de variar las concentraciones de calcio citoplasmáticas, las cuales son críticas para la actividad de numerosas proteínas dependientes de este ión (Balaban RS, 2009). Se trabajó con Thapsigargin (10 μM), un inhibidor del canal SERCA del ER que promueve la liberación de Ca<sup>2+</sup> al citoplasma (Thastrup O, et al. 1990). Neuronas KD para Mfn2 presentaron un aumento mayor del calcio citoplasmático detectado con la sonda Fluo-4 en comparación con el control (Shsc) una vez aplicado el inhibidor (**Figura 48 A**). Esto podría explicarse por el hecho que estas neuronas presentan un menor porcentaje de colocalización entre el ER y las mitocondrias además de una reducida capacidad de tamponamiento del calcio debido a un ΔΨ<sub>m</sub> más reducido. Al estar ambos orgánulos más

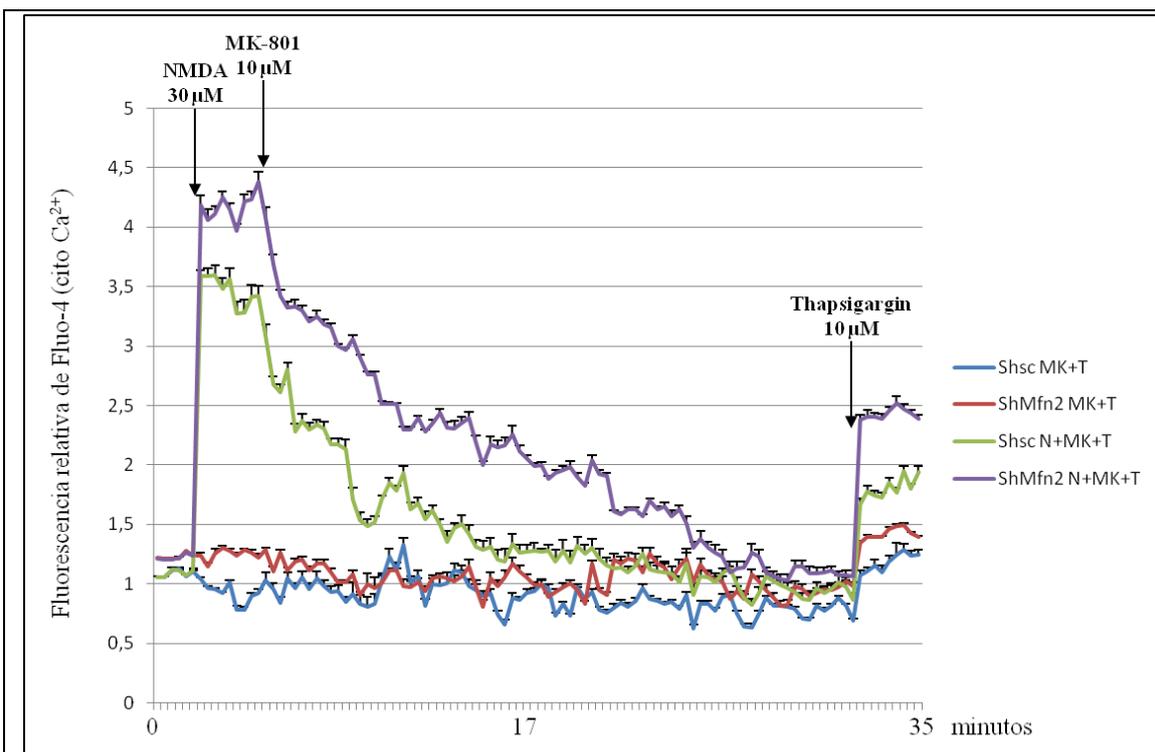
separados en el espacio, el calcio que se libera por el canal SERCA al utilizar la Thapsigargin queda en el citoplasma y no es tamponado tan eficientemente por las mitocondrias a pesar de que se observa una cierta reducción de la concentración de calcio citoplasmático. En la membrana externa mitocondrial encontramos el canal MCU para el calcio. Su afinidad depende mucho de la concentración del calcio disponible en el medio. La generación de las zonas MAM entre mitocondrias y ER genera una proximidad suficiente entre ambos orgánulos para que los MCU puedan funcionar más eficientemente (Rizzuto R, et al. 1998; Csordás G, et al. 1999). De modo, que una mejor proximidad entre los orgánulos favorecería la correcta captación y tamponamiento del calcio por parte de las mitocondrias. Al promoverse su separación durante la excitotoxicidad, esta capacidad disminuye considerablemente. Las neuronas Shsc, por otro lado, sí que son capaces de reducir los niveles de calcio en casi su totalidad. Utilizando el CCCP (10  $\mu$ M) para inhibir así totalmente la capacidad de las mitocondrias para tamponar el calcio y liberar a la vez el calcio de su interior, se demostró que los niveles del ión aumentan por igual tanto en las neuronas control (Shsc) como en las KD para Mfn2 (**Figura 48 B**). Por otro lado, la aplicación de la Thapsigargin y del CCCP al mismo tiempo muestra un aumento mayor del calcio citoplasmático en las neuronas KD para Mfn2 señalando que la diferencia con el control se corresponde al calcio almacenado en el ER (**Figura 48 C**). Estos datos indican que, en primer lugar, el ER de las neuronas KD para Mfn2 podría estar en un estado de estrés superior debido a la deficiencia de las mitocondrias en tamponar calcio y, segundo, que las mitocondrias de dichas neuronas están menos asociadas al ER, lo que corroboraría los resultados de colocalización. Además, teniendo en cuenta el contexto general, la generación de NO que se ha descrito que ocurre en excitotoxicidad (Barsoum MJ, et al. 2006; Cho DH, et al. 2009), puede aumentar el estrés del ER (Xu W, et al. 2004).



**Figura 48.** La caída de Mfn2 perjudica la captación de calcio liberado por el retículo endoplasmático por parte de las mitocondrias. **A)** En neuronas transfectadas con Shsc (control) o el ShMfn2 más el mitoRFP se han determinado los niveles de calcio citoplasmático utilizando la sonda Fluo-4. El cultivo se sometió a un tratamiento de 10 minutos con Thapsigargin (10  $\mu$ M), un inhibidor del canal SERCA (canal ATPasa de calcio) del retículo endoplasmático que promueve la liberación de calcio del RE hacia el citoplasma y, después, con CCCP (10  $\mu$ M) durante 5 minutos. El análisis se ha realizado con una n = 16 neuronas de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. **B)** Medición del calcio citoplasmático con la sonda Fluo-4 en neuronas infectadas con AAV que producen Shsc o ShMfn2 después de que las mitocondrias hayan sido despolarizadas con CCCP (10  $\mu$ M) durante durante el tiempo indicado. Análisis realizado con una n = 16 neuronas de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía

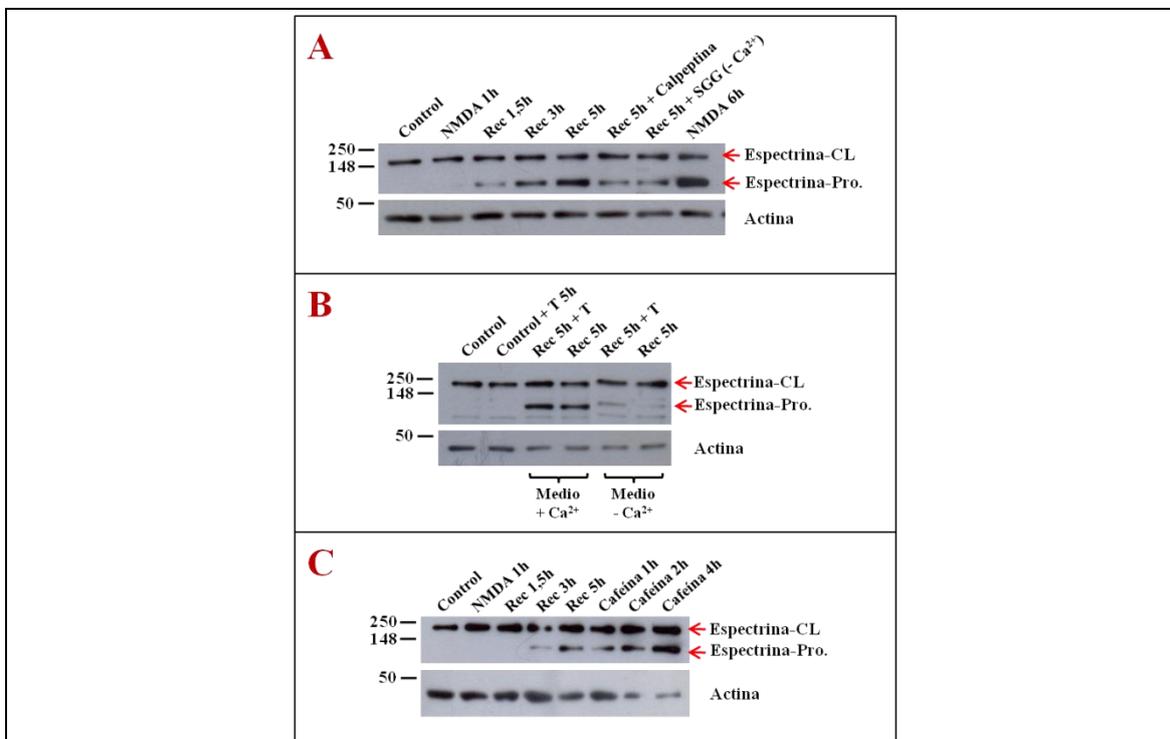
seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. C) Neuronas transfectadas con Shsc (control) y ShMfn2. El calcio citoplasmático se ha medido con la sonda Fluo-4 al tratar las células con Thapsigargin (10  $\mu\text{M}$ ) y CCCP (10  $\mu\text{M}$ ) a la vez durante el tiempo indicado. Análisis realizado con una  $n = 16$  neuronas de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni.

La excitotoxicidad promueve la entrada masiva de iones calcio al interior de la neurona y perjudica la comunicación entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias. Para estudiar este fenómeno utilizamos neuronas control (Shsc) y KD para Mfn2 (ShMfn2) a las que tratamos con NMDA (30  $\mu\text{M}$ ) durante 3 minutos para promover la entrada de calcio y seguido del agonista MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ) del receptor NMDA para frenar el flujo de calcio durante el tiempo indicado. Los valores del calcio citoplasmático analizados con Fluo-4 demostraron una reducción de sus niveles hasta recuperar el estado inicial después de haber utilizado el inhibidor en las neuronas control y las transfectadas con ShMfn2. Ésta reducción no es tan pronunciada en las células KD para Mfn2 debido a la dificultad de las mitocondrias en tamponar el calcio (**Figura 49 A**). En este contexto, casi toda la acción de eliminación de calcio del citoplasma pasa a depender de otros orgánulos como el ER y de los canales de la membrana plasmática de la célula. A continuación tratamos las neuronas con Thapsigargin (10  $\mu\text{M}$ ) durante el tiempo indicado y observamos que las neuronas KD para Mfn2 presentaban un aumento mayor en el calcio citoplasmático en comparación con las control debido también a la mayor acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER.



**Figura 49.** En excitotoxicidad las neuronas deficientes en Mfn2 son incapaces de tamponar el calcio liberado por el retículo endoplasmático. **A)** Análisis del calcio citoplasmático con la sonda Fluo-4 en neuronas control (Shsc) y KD para Mfn2 (ShMfn2) tratadas con NMDA (30  $\mu\text{M}$ ) durante 3 minutos, el inhibidor MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ) del receptor NMDA durante 8 minutos y Thapsigargin (10  $\mu\text{M}$ ) durante 15 minutos. El análisis se ha realizado con una  $n = 12$  neuronas de 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni.

Ligado a este aumento exacerbado del calcio citoplasmática debido a una comunicación deficiente entre el ER y las mitocondrias, analizamos por Western Blot la actividad de la proteasa Calpaína que se activa por el calcio (Khorchid A & Ikura M, 2002). Para ello se miraron los niveles proteicos de Espectrina procesada, una proteína del citoesqueleto degradada por la Calpaína (Robert-Lewis JM, et al. 1994). La Espectrina es una de las proteínas más abundantes de la cara interna de la membrana plasmática y se encarga de mantener la estructura del citoesqueleto y de la propia membrana plasmática (Huh GY, et al. 2001). Las neuronas fueron tratadas con NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora y el medio de cultivo se lavó y cambió por otro fresco para dejar recuperar las células. Los resultados obtenidos muestran un aumento progresivo de la cantidad de Espectrina procesada a medida que el tiempo de recuperación aumentaba (**Figura 50 A**). En las recuperaciones de 5 horas tratadas también con el inhibidor Calpeptina (10  $\mu$ M) de la Calpaína y la aplicación de un medio SGG sin  $\text{Ca}^{2+}$  son suficientes para reducir de forma significativa la acción de la proteasa. Por otro lado, el tratamiento con solamente Thapsigargin (10  $\mu$ M) durante 5 horas no parece promover la activación de la proteasa al liberarse el  $\text{Ca}^{2+}$  del ER al citoplasma ya que las mitocondrias deben estar tamponándolo y los canales de calcio de la membrana plasmática deben estar expulsándolo (**Figura 50 B**). La utilización de un medio sin calcio añadido en el momento del lavado después de 1 hora de tratamiento con NMDA (30  $\mu$ M), no parece promover la activación de la Calpaína, pero si se añade Thapsigargin también tras el lavado, el calcio liberado por el ER activa ligeramente la proteasa. En un medio con calcio, las respuestas son las mismas pero más acentuadas. Estas observaciones vienen sostenidas por el hecho que a estos tiempos los niveles proteicos de Mfn2 ya han disminuido (**Figura 42**) y la comunicación entre las mitocondrias y el ER sería deficiente. En estas circunstancias, las mitocondrias no serían aptas para tamponar el calcio liberado por el ER al tratar con Thapsigargin con tanta eficiencia y esto llevaría a una mayor activación de la Calpaína.



**Figura 50.** Una comunicación deficiente entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias provoca una mayor activación de la proteasa Calpaína. Western Blots contra la proteína Espectrina-cadena larga

---

(Espectrina-CL) y la Espectrina-procesada (Espectrina-Pro.). **A)** Western Blot representativo de Espectrina en neuronas tratadas con NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora, lavadas y dejando que se recuperen en medio fresco sin NDMA durante las horas indicadas. Las recuperaciones de 5 horas tras el tratamiento se han combinado con el inhibidor Calpeptina (10  $\mu$ M) de la Calpaína, el BAPTA (10  $\mu$ M), una molécula que une calcio y medio SGG sin  $\text{Ca}^{2+}$ . WB realizado con una  $n = 3$  experimentos independientes. **B)** Western Blot representativo de Espectrina en neuronas tratadas con Thapsigargin (10  $\mu$ M) durante 6 horas. Las recuperaciones de 5 horas se hicieron tras 1 hora de tratamiento con NMDA (30  $\mu$ M). Estas neuronas se dejaron 5 horas en medio SGG con o sin  $\text{Ca}^{2+}$  y con o sin Thapsigargin (10  $\mu$ M). WB realizado con una  $n = 3$  experimentos independientes. **C)** Western Blot representativo de Espectrina en neuronas tratadas con NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora, lavadas y dejando que se recuperen en medio fresco sin NDMA durante las horas indicadas. Se ha aplicado la Cafeína (20  $\mu$ M) durante las horas marcadas para comprobar la activación de la Calpaína. WB realizado con una  $n = 3$  experimentos independientes.

También se ha utilizado la Cafeína (20  $\mu$ M), un antagonista del receptor de adenosina e inhibidor de la enzima AMPc que se ha descrito que genera la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de todos los compartimentos celulares, que actúan como reservorios de calcio, hacia el citoplasma (Usachev Y, et al. 1993; Tsai TD & Barish ME, 1995) y acaba promoviendo la muerte celular (Xing H, et al. 2004), como comprobante del efecto del aumento de calcio intracelular en la activación de la Calpaína. Los resultados muestran un aumento progresivo de dicha actividad a medida que aumenta el tiempo de tratamiento (**Figura 50 C**).

### **La caída de los niveles de Mfn2 interviene en una vía de muerte tardía promovida por la excitotoxicidad**

En el apartado anterior se ha descrito como unos niveles reducidos de Mfn2 pueden acarrear respuestas perjudiciales para las mitocondrias y la mismísima neurona ya que el aporte de energía en forma de ATP y el tamponamiento del calcio queda seriamente afectado en un contexto de excitotoxicidad. A raíz de ello nos preguntamos si la reducción de Mfn2 tiene consecuencias palpables para la viabilidad celular. Para demostrarlo, el Dr. Francesc Soriano transfectó las neuronas con los mismos Shsc o ShMfn2 y trató el cultivo con dosis sub-tóxicas de NMDA (15  $\mu$ M). Observó que esta estimulación era suficiente para promover un aumento significativo de la muerte celular en las neuronas KD para Mfn2 con respecto al control. Los otros dos shRNAs desarrollados contra Mfn2, el ShMfn2 (2) y el ShMfn2 (3), también mostraron resultados muy parecidos, descartando así la posibilidad de un efecto secundario en nuestro modelo. El siguiente paso fue intentar revertir el efecto sobreexpresando Mfn2. Como cabía esperar, se observó una protección importante (50 %) tras tratar las neuronas con NMDA. Cabe resaltar que esta protección no es debida al restablecerse la morfología mitocondrial ya que la sobreexpresión de Mfn1 no demostró ningún efecto protector significativo. Esta observación concuerda también con las múltiples funciones que desencadena Mfn2 y no son compartidas con Mfn1, tal como se ha comentado con anterioridad. Los resultados pueden consultarse en la Figura 5 y S5 del Artículo publicado en la revista EMBO J. (**ANEXO 2**).

Después de una corta exposición de las neuronas al glutamato, se ha descrito que algunas de las células mueren por necrosis. Las neuronas supervivientes pueden ser capaces de recuperarse total- o parcialmente y promover la forma de muerte más tardía por apoptosis dependiendo de buen funcionamiento de las mitocondrias (Ankarcrona M, et al. 1995; Luetjens CM, et al. 2000). Se ha estudiado cómo la sobreexpresión de Mfn2 exógena puede afectar las distintas fases

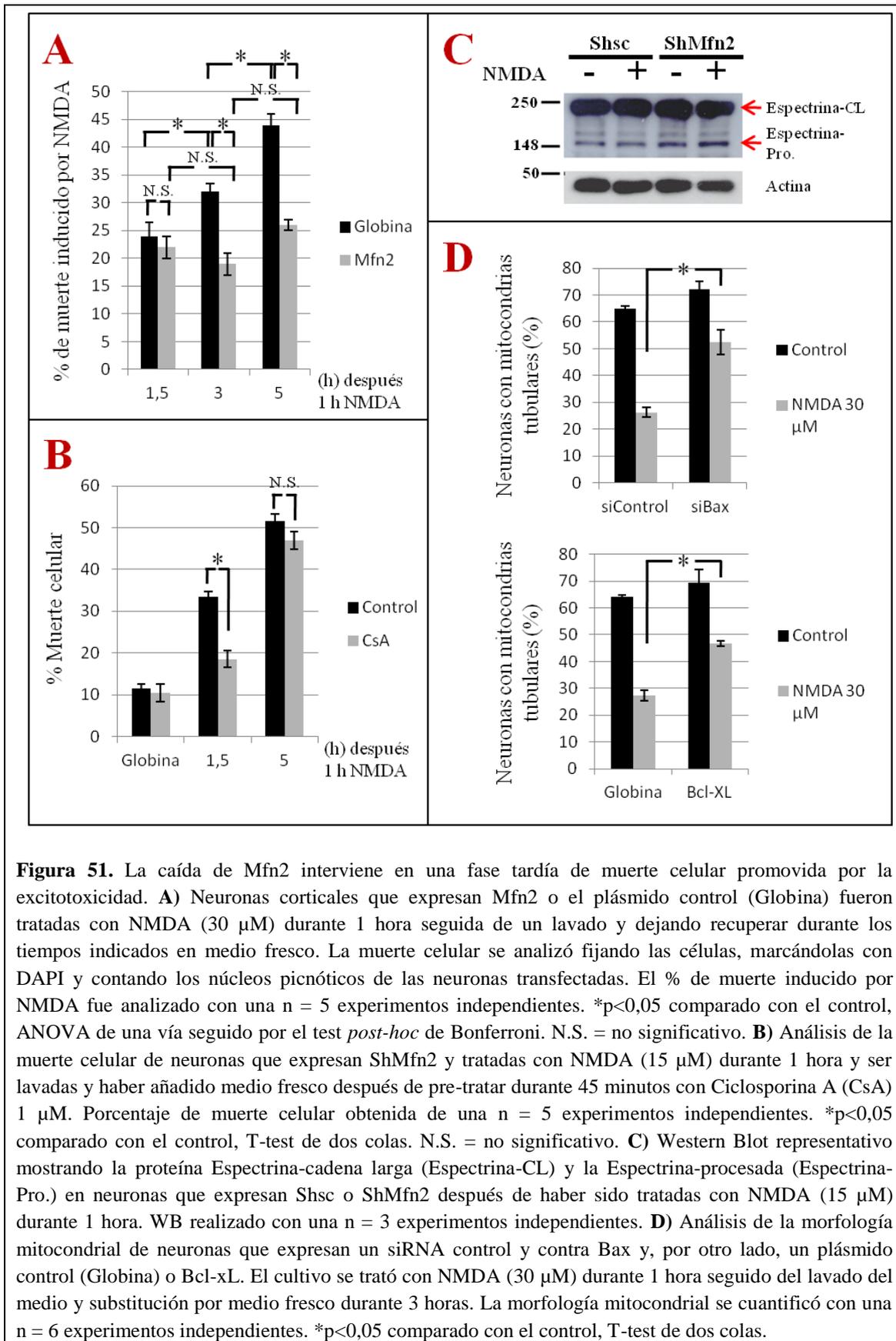
---

de muerte celular bajo excitotoxicidad. Para ello se determinó la muerte celular después de 1 hora de tratamiento con NMDA (30  $\mu$ M) seguido del procedimiento de lavado y recuperación en medio fresco descrito con anterioridad. Después de 1,5 horas de recuperación (es decir, 2,5 horas después de iniciarse el insulto) cerca del 25 % de las neuronas mueren sin que la sobreexpresión de Mfn2 pueda proteger. De este punto en adelante y correlacionando con la caída de los niveles endógenos de Mfn2 a causa de la excitotoxicidad, la muerte celular aumentó progresivamente en el control (transfectado con Globina) pero la sobreexpresión de Mfn2 conseguía bloquear completamente la muerte celular más tardía (**Figura 51 A**).

Hay muchas evidencias y bibliografía al respecto que afirman que la abertura del *permeability transition pore* (PTP, por sus siglas en inglés) y la muerte celular por necrosis ocurre durante las fases tempranas de la excitotoxicidad de forma opuesta a la apoptosis que cursa durante fases más tardías (Dirnagl U, et al. 1999). Exactamente lo mismo es lo que se ha identificado en nuestro modelo ya que la inhibición del PTP con Ciclosporina A (CsA), no ha sido suficiente para proteger las neuronas KD para Mfn2 ante dosis sub-tóxicas de NMDA (15  $\mu$ M) a tiempos largos (**Figura 51 B**). Durante la fase tardía de muerte celular promovida por la excitotoxicidad, la proteína pro-apoptótica Bax es translocada a la mitocondria para promover la formación del *mitochondrial outer membrane permeabilization* (MOMP, por sus siglas en inglés) (Xiang H, et al. 1998; D'Orsi B, et al. 2012; Shelat PB, et al. 2013). Hace relativamente poco se describió que Bax interacciona con Mfn2 (Karbowski M, et al. 2006; Brooks C, et al. 2007) y que la propia Mfn2 puede interferir la activación de Bax (Sugioka R, et al. 2004; Neuspiel M, et al. 2005). En concordancia con los datos disponibles que demuestran la activación de la proteasa Calpaína tras la activación de Bax (D'Orsi B, et al. 2012), se observó en nuestros cultivos neuronales KD para Mfn2 una estimulación aumentada de dicha proteasa fijándonos en los niveles de Espectrina, como ya se ha comentado, es una proteína del citoesqueleto degradada por la Calpaína (Robert-Lewis JM, et al. 1994) (**Figura 51 C**).

Para sacar un poco de luz sobre todo esto, se adquirió un siRNA para bloquear Bax (siBax) de y el Dr. Francesc Soriano fue capaz de frenar la muerte celular en neuronas KD para Mfn2 tratadas con NMDA (15  $\mu$ M). Además, la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL también bloqueaba la muerte celular. Los resultados pueden consultarse en la Figura 5 y S5 del Artículo publicado en la revista EMBO J. (**ANEXO 2**).

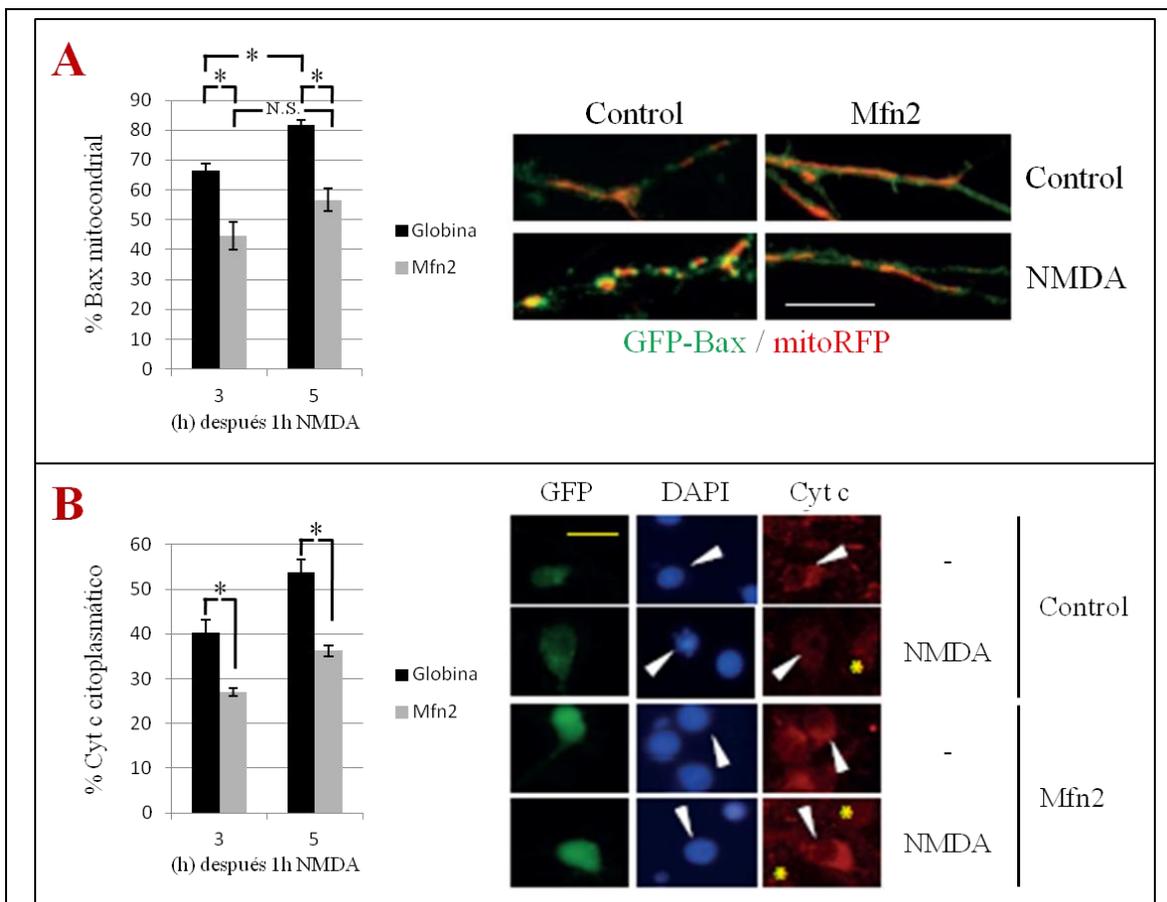
Por otro lado, conforme al *rol* de la familia de proteínas Bcl-2 en la regulación de la dinámica mitocondrial, se utilizaron las construcciones siBax y Bcl-xL para transfectar las neuronas y se previno parcialmente la fragmentación mitocondrial tardía después de aplicar el NMDA (30  $\mu$ M) (**Figura 51 D**).



**Figura 51.** La caída de Mfn2 interviene en una fase tardía de muerte celular promovida por la excitotoxicidad. **A)** Neuronas corticales que expresan Mfn2 o el plásmido control (Globina) fueron tratadas con NMDA (30 μM) durante 1 hora seguida de un lavado y dejando recuperar durante los tiempos indicados en medio fresco. La muerte celular se analizó fijando las células, marcándolas con DAPI y contando los núcleos picnóticos de las neuronas transfectadas. El % de muerte inducido por NMDA fue analizado con una n = 5 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. N.S. = no significativo. **B)** Análisis de la muerte celular de neuronas que expresan ShMfn2 y tratadas con NMDA (15 μM) durante 1 hora y ser lavadas y haber añadido medio fresco después de pre-tratar durante 45 minutos con Ciclosporina A (CsA) 1 μM. Porcentaje de muerte celular obtenida de una n = 5 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas. N.S. = no significativo. **C)** Western Blot representativo mostrando la proteína Espectrina-cadena larga (Espectrina-CL) y la Espectrina-procesada (Espectrina-Pro.) en neuronas que expresan Shsc o ShMfn2 después de haber sido tratadas con NMDA (15 μM) durante 1 hora. WB realizado con una n = 3 experimentos independientes. **D)** Análisis de la morfología mitocondrial de neuronas que expresan un siRNA control y contra Bax y, por otro lado, un plásmido control (Globina) o Bcl-xL. El cultivo se trató con NMDA (30 μM) durante 1 hora seguido del lavado del medio y sustitución por medio fresco durante 3 horas. La morfología mitocondrial se cuantificó con una n = 6 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas.

A continuación se analizó cómo la sobreexpresión de Mfn2 exógena puede afectar las translocación de Bax a la mitocondria en excitotoxicidad. Se observó que en neuronas

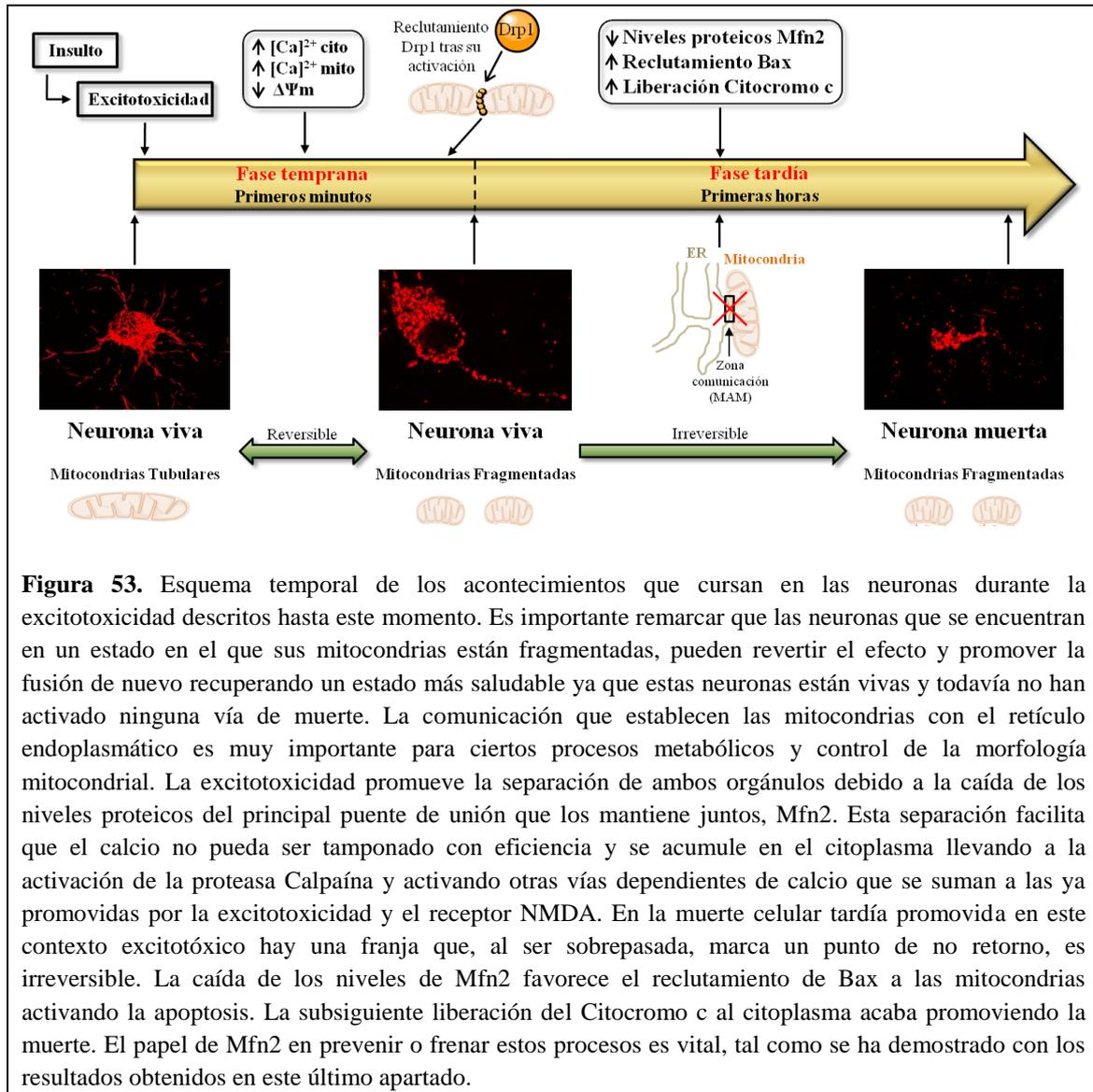
transfectadas con GFP-Bax, la ubicación de Bax era generalmente citoplasmática y que el tratamiento con NMDA (30  $\mu$ M) producía su reclutamiento hacia la mitocondria, formando los típicos puntos de colocación en los extremos de las mitocondrias donde podría haber ocurrido un proceso de fisión (Karbowski M, et al. 2002; Yuan H, et al. 2006) (**Figura 52 A**). La traslocación de Bax a la mitocondria es progresiva después del tratamiento con NMDA y la expresión de Mfn2 mostró menos reclutamiento de Bax en comparación con las neuronas control que expresaban Globina. Como cabía esperar, la vía de muerte celular tardía promovida por el NMDA que implica la liberación del Citocromo c de las mitocondrias al citoplasma, era bloqueado también con la sobreexpresión de Mfn2 de una forma parecida al reclutamiento de Bax (**Figura 52 B**). Estos experimentos se desarrollaron haciendo marcajes de inmunofluorescencia de Citocromo c en neuronas que expresaban el plásmido control (Globina) o Mfn2. Para saber que neuronas eran las transfectadas, también se utilizó GFP.



**Figura 52.** La sobreexpresión de Mfn2 bloquea el reclutamiento de Bax a la mitocondria y la liberación de Citocromo c al citoplasma. **A)** Análisis e imágenes representativas de la localización de Bax a la mitocondria en neuronas transfectadas con GFP-Bax y mitoRFP más Globina o Mfn2 y tratadas con NMDA (30  $\mu$ M) durante 1 hora seguido del lavado del medio y dejar recuperar el cultivo durante los tiempos indicados en medio fresco. Análisis de Bax realizado con una n = 3-5 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. N.S. = no significativo. Barra de escala = 10  $\mu$ m. **B)** Inmunofluorescencia para detectar el Citocromo c en neuronas transfectadas con GFP más Globina (control) o Mfn2 y tratadas con NMDA igual que en (A). Las flechas señalan las neuronas transfectadas. Los asteriscos apuntan células que han perdido el Citocromo c o lo tienen difuso en el citoplasma. Análisis del porcentaje de liberación de

Citocromo c al citoplasma realizado con una n = 5 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .

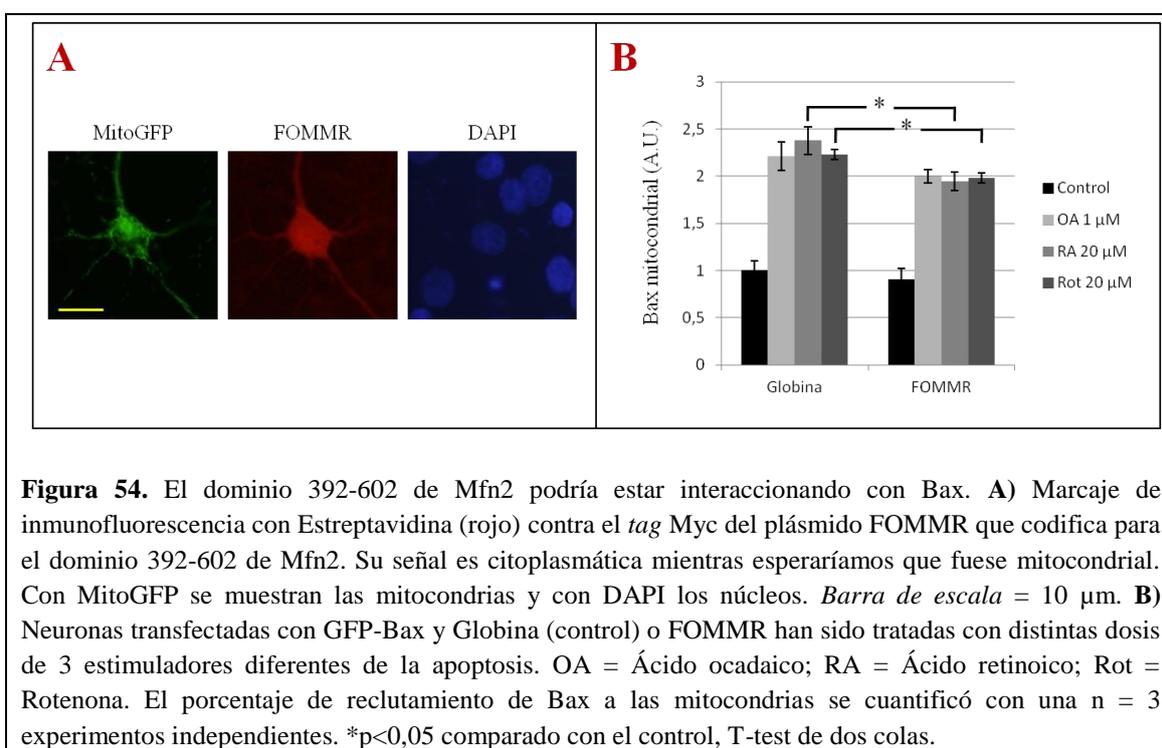
Nuestros datos indican que la reducción tardía de los niveles de Mfn2 comporta serios problemas a las mitocondrias y acrecienta la muerte celular por excitotoxicidad promoviendo el reclutamiento de Bax y la liberación del Citocromo c. En la **Figura 53** se muestra un esquema actualizado.



#### *Possible interacción entre Mfn2 y Bax*

Se sospecha de un dominio de Mfn2 que podría ser el responsable de hacer facilitar la interacción con la proteína pro-apoptótica Bax (Karbowski M, et al. 2006). A pesar de haberse descrito ya la colocalización de ambas proteínas por inmunofluorescencia (Karbowski M, et al. 2002) no se conoce la forma con la que se lleva a cabo. Para profundizar en esto, se decidió crear por clonación el susodicho dominio de Mfn2 que corresponde a los aa 392-602 de la proteína añadiendo un péptido señal para que pueda ser insertado a la membrana externa de las mitocondrias, lo llamamos FOMMR. El objetivo era sobreexpresar esta construcción y promover

la apoptosis con distintos estímulos con tal de analizar el grado de protección ante la muerte neuronal. Utilizamos el ácido ocaidaico (1  $\mu\text{M}$ ), el ácido retinoico (20  $\mu\text{M}$ ) y la Rotenona (20  $\mu\text{M}$ ) como estimuladores de la apoptosis. Primero de todo se comprobó que la construcción clonada efectivamente expresaba lo que queríamos. Para ello se transfectaron las neuronas con GFP y FOMMR y se llevó a cabo una inmunofluorescencia con Estreptavidina (rojo) contra el *tag Myc* que incluye la construcción para localizar la ubicación del dominio expresado. A diferencia de lo que esperábamos, se vió que la señal era totalmente ubicua por todo el interior celular y no parecía localizar en las mitocondrias (**Figura 54 A**). De todas formas se decidió probar su funcionamiento y lo transfectamos en neuronas para tratarlas, 72 horas después, con los distintos estimuladores de la apoptosis y comparar el efecto con las que sobreespresaban Globina (control). Se obtuvieron resultados significativos con el RA 20  $\mu\text{M}$  y la Rot 20  $\mu\text{M}$  (**Figura 54 B**).

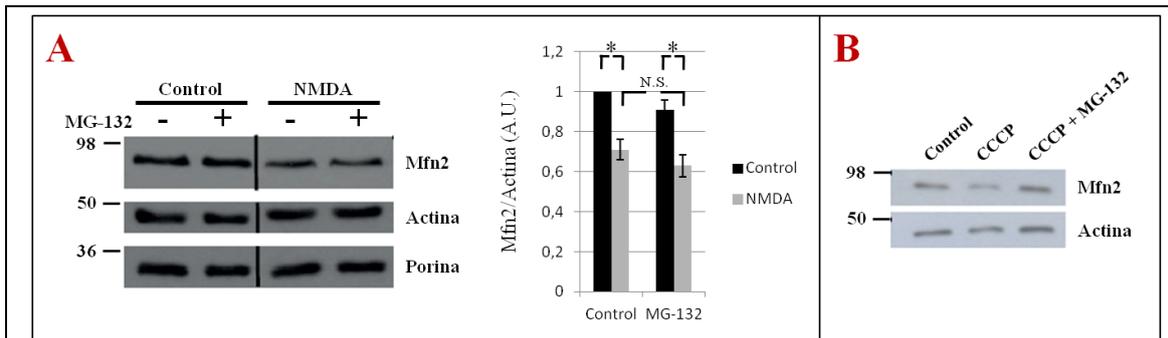


A pesar de los resultados obtenidos, es necesario profundizar más en el posible efecto de protector de FOMMR y revisar su construcción para asegurar su localización en las mitocondrias. La inmunofluorescencia nos dice que la construcción es citoplasmática, quizás está interactuando con Bax en el citosol impidiendo su reclutamiento a las mitocondrias. Este efecto, por tanto, podría estar subestimado porque en el citosol la interacción entre proteínas es más complicada. Si se diese en la superficie de las mitocondrias esperaríamos que se daría un efecto de interacción más potenciado y, probablemente, otorgaría más protección ante los estimuladores de la apoptosis.

### En excitotoxicidad Mfn2 es regulada a nivel transcripcional

Llegados a este punto y sabiendo lo importante que es para las mitocondrias mantener los niveles óptimos de Mfn2, nos planteamos investigar mediante qué mecanismo la expresión de Mfn2 se ve comprometida en excitotoxicidad. Hay bastante bibliografía al respecto que

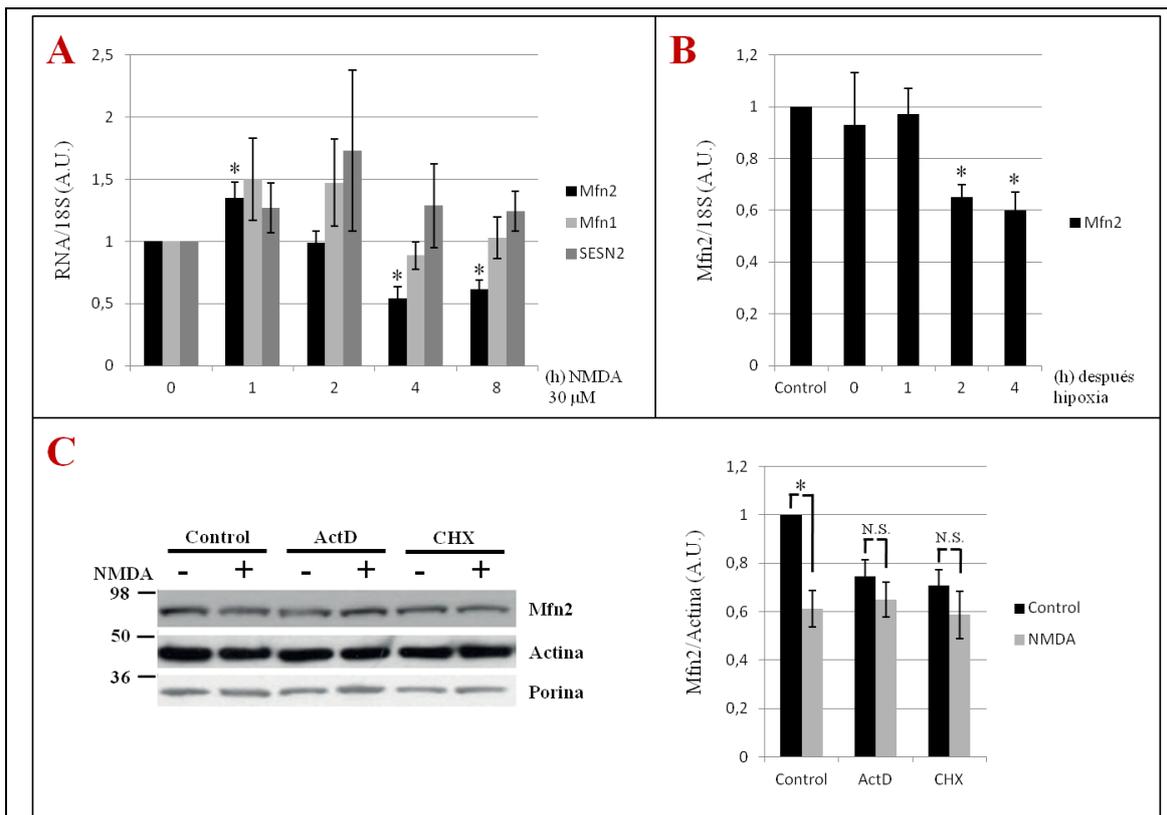
presentan varias vías de degradación de Mfn2 vía proteasoma en distintos contextos. Una de las más conocidas es la promovida por la enzima E3 ligasa Parkin (Tanaka A, et al. 2010; Chan NC, et al. 2011). Nos propusimos comprobar si la caída en los niveles proteicos de Mfn2 en excitotoxicidad (tal como habíamos visto por Western Blot tanto en los dos modelos *in vitro* de isquemia como en el *in vivo*) era debido a la acción del proteasoma. Sorprendentemente encontramos que al pre-tratar las neuronas con MG-132, un inhibidor del proteasoma, no era suficiente para bloquear la caída de la proteína Mfn2 en excitotoxicidad (**Figura 55 A**). Se trataron las neuronas con CCCP (1  $\mu$ M) para provocar la pérdida del potencial de membrana mitocondrias y la subsiguiente degradación vía proteasoma de Mfn2 y vimos que el MG-132 bloqueaba esta eliminación de Mfn2 (**Figura 55 B**). Con esto podemos concluir que la caída de Mfn2 en excitotoxicidad no implica al proteasoma.



**Figura 55.** Mfn2 no es degradada vía proteasoma en excitotoxicidad. Las neuronas corticales con o sin incubación con el inhibidor de proteasoma MG-132 (10  $\mu$ M) fueron tratadas durante 4 horas con NMDA (30  $\mu$ M) y los niveles proteicos de Mfn2 fueron analizados mediante Western Blot. **A**) WB representativo de Mfn2, Actina y Porina. El análisis de la densitometría se realizó con una n = 7 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. N.S. = no significativo. **B**) El CCCP promueve la degradación de Mfn2 vía proteasoma y esta puede ser bloqueada al utilizar el MG-132. Las neuronas corticales fueron tratadas con CCCP (10  $\mu$ M) durante 1 hora en ausencia o presencia del MG-132 (10  $\mu$ M).

Hay bibliografía al respecto que muestra que la excitotoxicidad causa cambios en los programas transcripcionales (Zhang SJ, et al. 2007; Cook DJ, et al. 2012) que podrían ser consistentes con el lento efecto que hemos observado del NMDA sobre la expresión de Mfn2. Nos focalizamos en investigar mejor si la reducción de los niveles proteicos de Mfn2 se debían a cambios producidos en su expresión génica. Mediante RT-qPCR se vió que los niveles de mRNA de Mfn2 aumentaban en un inicio durante la primera hora de tratamiento con NMDA (30  $\mu$ M), probablemente debido a un mecanismo de defensa de las neuronas ya que, durante esta primera hora, hay que recordar que Drp1 ya se ha activado y está empezando a fisionar las mitocondrias. De hecho, la expresión de Mfn2 no empezó a disminuir de forma significativa hasta después de 4 horas de tratamiento y permanece estable hasta las 8 horas (**Figura 56 A**). Además, podemos concluir que el efecto en la expresión de Mfn2 que vemos mediante RT-qPCR es específica ya que la expresión de la proteína mitocondrial Mfn1 y la citoplasmática Sestrina 2 (SESN2) no se ven afectadas a lo largo del tiempo de tratamiento con NMDA. También se miraron los niveles de mRNA de Mfn2 en el modelo de hipoxia (OGD) *in vitro* y se obtuvo un resultado muy similar (**Figura 56 B**). Estos experimentos correlacionan perfectamente con la caída de la proteína de Mfn2 en los dos modelos *in vitro* de isquemia.

Estos datos indican que la expresión génica de Mfn2 se ve reducida durante la excitotoxicidad pero no descarta la posible acción de múltiples proteasas que podrían activarse en este contexto y estar proteolizando a Mfn2. Para verificar que un cambio transcripcional es el principal mecanismo responsable de la caída de la expresión de Mfn2 en excitotoxicidad, se utilizó el inhibidor de la transcripción Actinomicina D (10  $\mu$ M) y el inhibidor de la traducción Ciclohexamina (10  $\mu$ M), por separado. Tal como se esperaba, la utilización de dichos inhibidores reducía los niveles proteicos de Mfn2 pero no se observó ninguna caída adicional significativa después de utilizar NMDA (30  $\mu$ M), tal como se esperaría si un proceso de proteólisis fuese el responsable de mediar la reducción de Mfn2 en excitotoxicidad (**Figura 56 C**).



**Figura 56.** Mfn2 es regulada a nivel transcripcional en excitotoxicidad. **A)** Las neuronas corticales fueron tratadas con NMDA (30  $\mu$ M) durante los tiempos indicados y los niveles de mRNA de Mfn2, Mfn1 y Sestrina 2 (SESN2) se determinaron con la RT-qPCR. El análisis fue desarrollado con una n = 4 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas. Normalizado con el rRNA 18S. **B)** Neuronas corticales fueron sometidas a hipoxia (OGD) en ausencia de glucosa durante 1 hora y vueltas a medio y condiciones normóxicas durante los tiempos indicados. Se midieron los niveles de mRNA de Mfn2 por RT-qPCR. El análisis fue desarrollado con una n = 4 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas. Normalizado con el rRNA 18S. **C)** Las neuronas corticales fueron tratadas NMDA (30  $\mu$ M) y con el inhibidor de la transcripción Actinomicina D (10  $\mu$ M) o el inhibidor de la traducción Ciclohexamina (10  $\mu$ M) durante 4 horas y los niveles de Mfn2 se analizaron por Western Blot (aquí se ha incluido uno representativo). El análisis de la densitometría se realizó con una n = 4 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas. N.S. = no significativo.

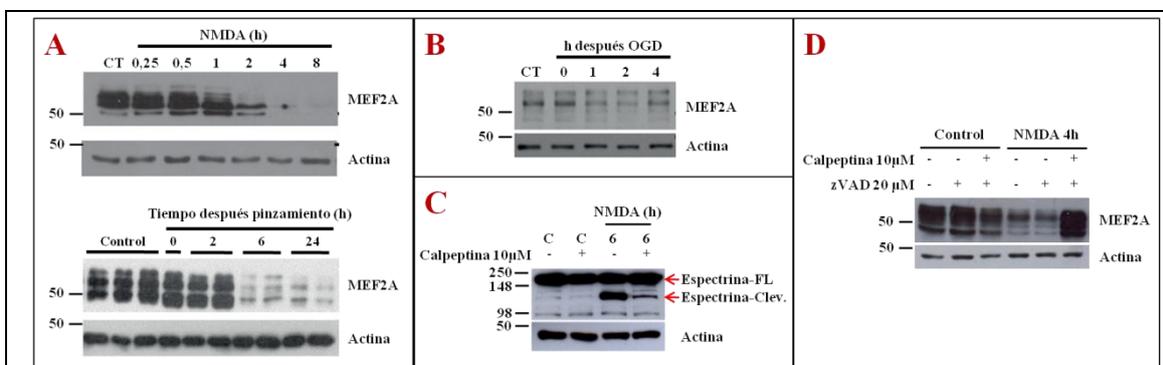
Aquí hemos demostrado claramente con estos experimentos que el principal mecanismo que promueve la caída de la expresión de Mfn2 bajo excitotoxicidad es a nivel transcripcional. Ni

las vías de degradación del proteasoma ni la acción de posibles proteasas activadas juegan un papel destacable en este contexto.

### La caída en la expresión de Mfn2 durante la excitotoxicidad depende de MEF2

Los factores de transcripción MEF2 (A-D) juegan un papel muy importante en el desarrollo y la supervivencia neuronal (Mao Z, et al. 1999; Flavell SW, et al. 2008). Durante la excitotoxicidad MEF2 es proteolizada por las caspasas y/o la calpaína generando una nueva forma de la proteína capaz de unirse al ADN pero sin su dominio de transactivación, actúa como una forma dominante negativo de MEF2 ya que ocupa su sitio de unión pero no promueve la transcripción (Li M, et al. 2001; Okamoto S-i, et al. 2002). Se llevaron a cabo distintos experimentos de Western Blot para cuantificar el efecto de la excitotoxicidad sobre el factor de transcripción MEF2A. Nuestros resultados *in vitro* de neuronas tratadas con NMDA (30  $\mu$ M) y el modelo OGD e *in vivo* durante los tiempos indicados, mostraron que los niveles proteicos de MEF2 disminuyen en nuestro modelo de excitotoxicidad a partir de la segunda hora de tratamiento (**Figura 57 A, B**). Estos resultados correlacionan muy bien con la caída de la expresión de Mfn2 a partir de la cuarta hora.

Teniendo en cuenta que la degradación de MEF2 en excitotoxicidad va ligada al aumento en las concentraciones de calcio, tal como se ha demostrado, y la posterior activación de la proteasa Calpaína (Smith PD, et al. 2006) o de las caspasas (Li M, et al. 2001; Okamoto S-I, et al. 2002; Tang X, et al. 2005), se decidió probar varios inhibidores específicos para comprobar la posibilidad de frenar la caída en los niveles proteicos de MEF2 y, por consiguiente, la fragmentación de las mitocondrias. En primer lugar se calculó la concentración óptima de Calpeptina, un inhibidor de la Calpaína, mediante Western Blot contra Espectrina, una proteína sustrato de la Calpaína (Robert-Lewis JM, et al. 1994). La concentración indicada utilizada en neuronas sometidas a 1 hora de NMDA (30  $\mu$ M), fue de 10  $\mu$ M (contrastado también con la bibliografía) (**Figura 57 C**). En combinación con la Calpeptina probamos el zVAD a 20  $\mu$ M, un inhibidor de las caspasas. En un principio suponíamos que inhibiendo las caspasas sería suficiente para bloquear la degradación de MEF2 pero no fue así, fue necesario utilizar la combinación de ambos para bloquear totalmente la caída tras 4 horas de tratamiento con NMDA 30  $\mu$ M (**Figura 57 D**).



**Figura 57.** Los niveles proteicos de MEF2 caen en excitotoxicidad. **A)** Neuronas tratadas con NMDA 30  $\mu$ M durante los tiempos indicados para ver la caída de MEF2 por Western Blot en un modelo *in vitro* (WB superior) e *in vivo* (WB inferior) en ratas sometidas a MCAO más 90 minutos de pinzamiento de la arteria carótida ipsilateral seguida de su liberación durante los tiempos indicados. CT = Control. **B)** El

---

Western Blot superior corresponde a MEF2 en el modelo *in vitro* sometido a hipoxia (OGD) durante 1 hora y devuelto a las condiciones normales de oxígeno y glucosa durante los tiempos indicados. **C)** Western Blot representativo mostrando Espectrina-*full length* (Espectrina-FL) y la Espectrina-*cleaved* (Espectrina-Clev.) marcada con una flecha roja de neuronas corticales sometidas a 45 minutos con Calpeptina (10  $\mu$ M) un inhibidor de la enzima Calpaína, antes de 1 hora de tratamiento con NMDA 30  $\mu$ M para probar la concentración efectiva de Calpeptina. Repetido una  $n = 3$  experimentos independientes. **D)** WB representativo mostrando la protección ante la caída de los niveles proteicos de MEF2 de neuronas sometidas a 45 minutos con el inhibidor de caspasas zVAD (20  $\mu$ M) o junto con Calpeptina (10  $\mu$ M) antes de 1 hora con NMDA (30  $\mu$ M). Western blot repetido una  $n = 3$  experimentos independientes.

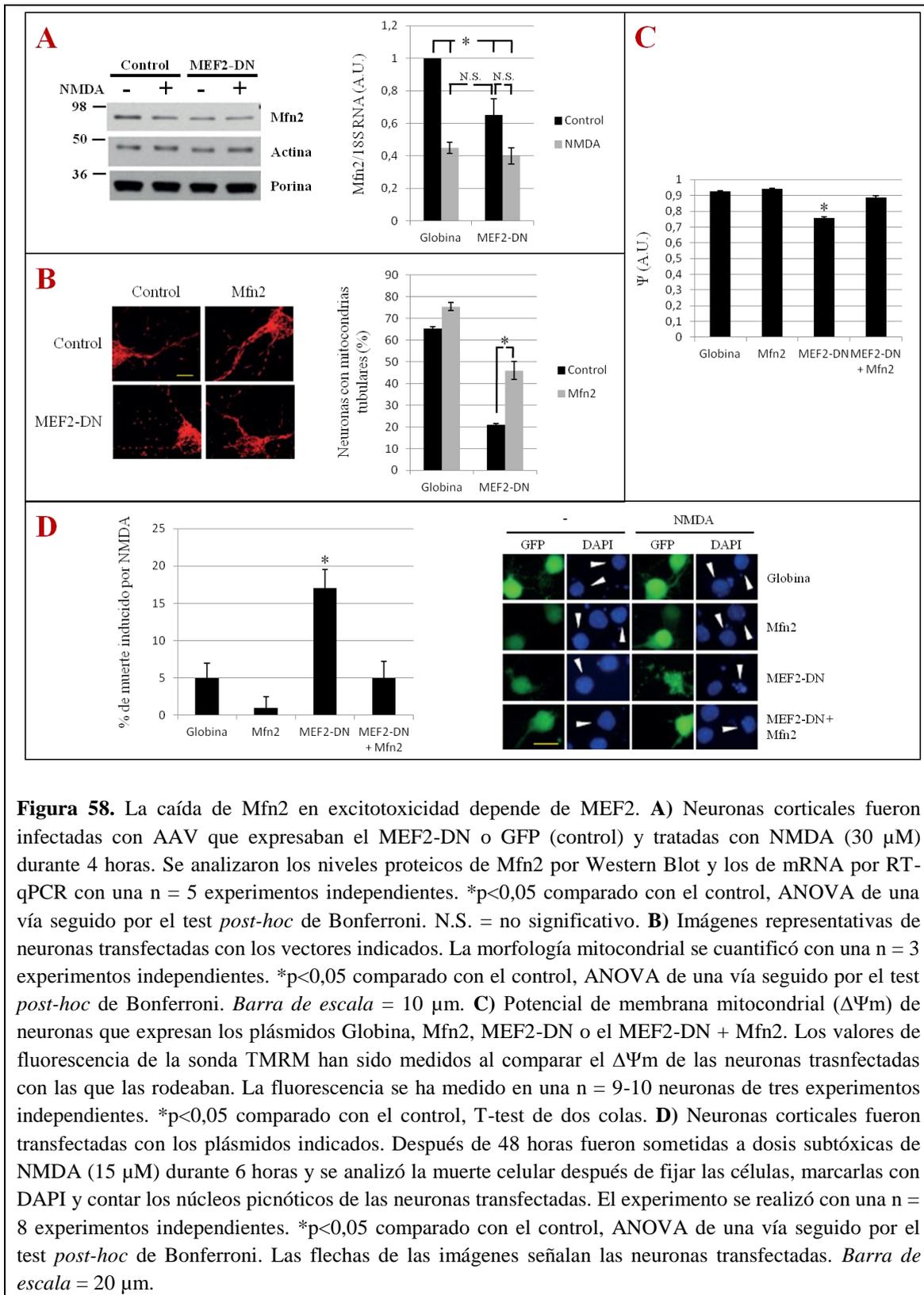
Estos experimentos abren la posibilidad de que la proteólisis de MEF2 dependiente de NMDA puede ser la responsable de hacer caer la expresión de Mfn2 en excitotoxicidad.

Para centrarnos en el posible papel de MEF2 en la regulación de Mfn2 en excitotoxicidad, el Dr. Francesc Soriano generó un AAV que expresa una forma dominante negativo de MEF2 (MEF2-DN). Esta, igual que la variante que se genera en la célula al activarse las caspasas, puede unirse al ADN pero carece de su dominio de transactivación. Los resultados obtenidos por él mostraron que la sobreexpresión de MEF2-DN era suficiente para reducir la expresión de Mfn2 a nivel proteico y de mRNA (**Figura 58 A**).

Consistente con el hecho de haber menos Mfn2 en la célula, estudiamos la morfología mitocondrial que neuronas transfectadas con el MEF2-DN y observamos que promueve la fragmentación. Al sobreexpresar Mfn2 exógena fuimos capaces de recuperar parcialmente el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares (**Figura 58 B**). Además y con relación a lo anterior, el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de estas neuronas se encuentra reducido en un 25 % con respecto al control (Globina) y estos niveles pueden recuperarse también al sobreexpresar Mfn2 exógena (**Figura 58 C**).

Por último, el Dr. Francesc Soriano analizó la viabilidad neuronal y observó que la expresión de MEF2-DN aumentaba significativamente el porcentaje de células muertas. De nuevo, la expresión de Mfn2 bloqueaba por completo esta muerte inducida con dosis sub-tóxicas de NMDA 15  $\mu$ M (**Figura 58 D**).

Todos estos resultados demuestran que la expresión de Mfn2 está regulada por MEF2 pero no contestamos la pregunta de si la degradación de MEF2 en excitotoxicidad es el factor principal que media la caída de Mfn2. Por eso, analizamos el mRNA de Mfn2 en neuronas infectadas con AAV que expresaban MEF2-DN y observamos que la caída de Mfn2 con respecto a su control (infectadas con GFP) en neuronas no mostró ningún efecto aditivo cuando se trataron con NMDA (**Figura 58 A**). Cabe resaltar que la eficiencia de infección de los AAV es de alrededor del 75–90 %, de modo que los resultados, en realidad, subestiman ligeramente la represión real que promueve el MEF2-DN. En su conjunto, estos datos demuestran un papel crucial por parte de MEF2 en la regulación de Mfn2 en un contexto de excitotoxicidad.



**Figura 58.** La caída de Mfn2 en excitotoxicidad depende de MEF2. **A)** Neuronas corticales fueron infectadas con AAV que expresaban el MEF2-DN o GFP (control) y tratadas con NMDA (30  $\mu$ M) durante 4 horas. Se analizaron los niveles proteicos de Mfn2 por Western Blot y los de mRNA por RT-qPCR con una n = 5 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. N.S. = no significativo. **B)** Imágenes representativas de neuronas transfectadas con los vectores indicados. La morfología mitocondrial se cuantificó con una n = 3 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. Barra de escala = 10  $\mu$ m. **C)** Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ m) de neuronas que expresan los plásmidos Globina, Mfn2, MEF2-DN o el MEF2-DN + Mfn2. Los valores de fluorescencia de la sonda TMRM han sido medidos al comparar el  $\Delta\Psi$ m de las neuronas transfectadas con las que las rodeaban. La fluorescencia se ha medido en una n = 9-10 neuronas de tres experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas. **D)** Neuronas corticales fueron transfectadas con los plásmidos indicados. Después de 48 horas fueron sometidas a dosis subtóxicas de NMDA (15  $\mu$ M) durante 6 horas y se analizó la muerte celular después de fijar las células, marcarlas con DAPI y contar los núcleos picnóticos de las neuronas transfectadas. El experimento se realizó con una n = 8 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. Las flechas de las imágenes señalan las neuronas transfectadas. Barra de escala = 20  $\mu$ m.

### La expresión basal de Mfn2 es regulada directamente por MEF2 en neuronas

Los siguientes objetivos que nos propusimos averiguar los realizó el Dr. Francesc X. Soriano y están representados en la Figura 8 y la Figura S8 del Artículo publicado en la revista EMBO J.

---

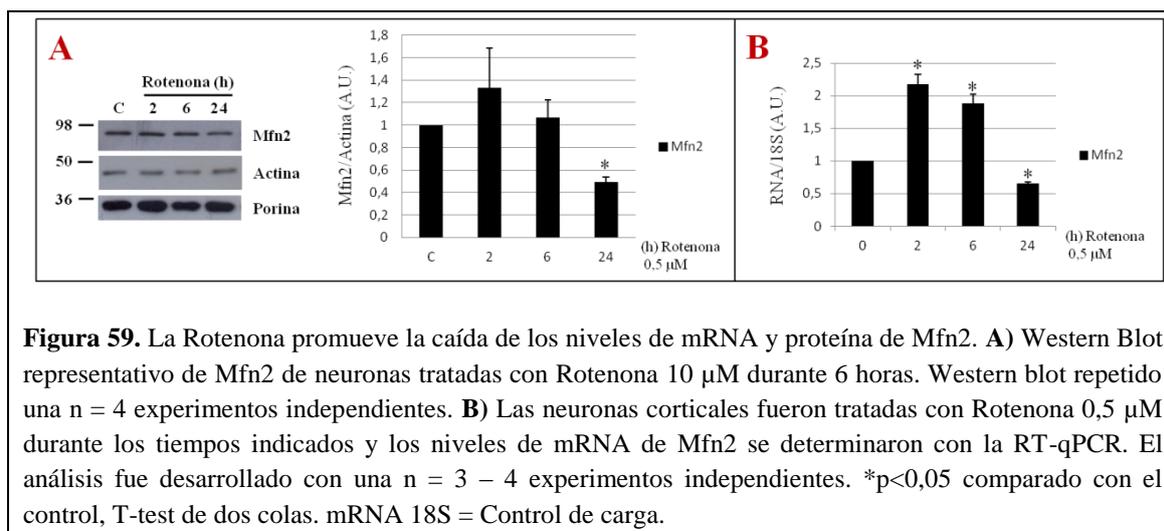
(ANEXO 2). De todos modos, a continuación se presentará un corto resumen comentando por encima los resultados más destacados para poder seguir mejor el hilo conductor de este trabajo.

Los resultados de este apartado demuestran que MEF2 regula directamente la expresión de Mfn2 en neuronas. Mediante ensayos de Luciferasa donde se vio que la utilización de MEF2-DN reprimía la actividad del promotor de Mfn2 en humanos y no lo hacía con otro promotor o en otra línea celular, demostrando que es una regulación específica de neuronas. A continuación se examinó el efecto de MEF2 en la actividad transcripcional del promotor de Mfn2. También con ensayos de Luciferasa se observó que la sobreexpresión de MEF2A activaba significativamente el promotor de Mfn2. Sabiendo esto, se detectaron dos posibles cajas de unión de MEF2 al promotor de Mfn2 y se comprobó que la secuencia -1332/-862 contenían estos posibles lugares de unión y por mutagénesis dirigida se demostró que la Caja 2 es el elemento-*cis* requerido para MEF2A. El siguiente paso fueron experimentos de EMSA con los que se corroboró que MEF2A se une a la Caja 2 descrita en el promotor de Mfn2. Por último, se diseñó un experimento de CHIP donde se encontró que, bajo condiciones basales, MEF2 se unía a la región del promotor pero después del tratamiento con NMDA esta unión se rompía.

Todas las observaciones hasta este punto respaldan la hipótesis que MEF2 regula la transcripción basal de Mfn2 en neuronas y, a consecuencia de su degradación en excitotoxicidad, los niveles de expresión de Mfn2 disminuyen.

## MFN2 ES IMPORTANTE PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE MITOFAGOSOMAS EN UN MODELO DE PARKINSON

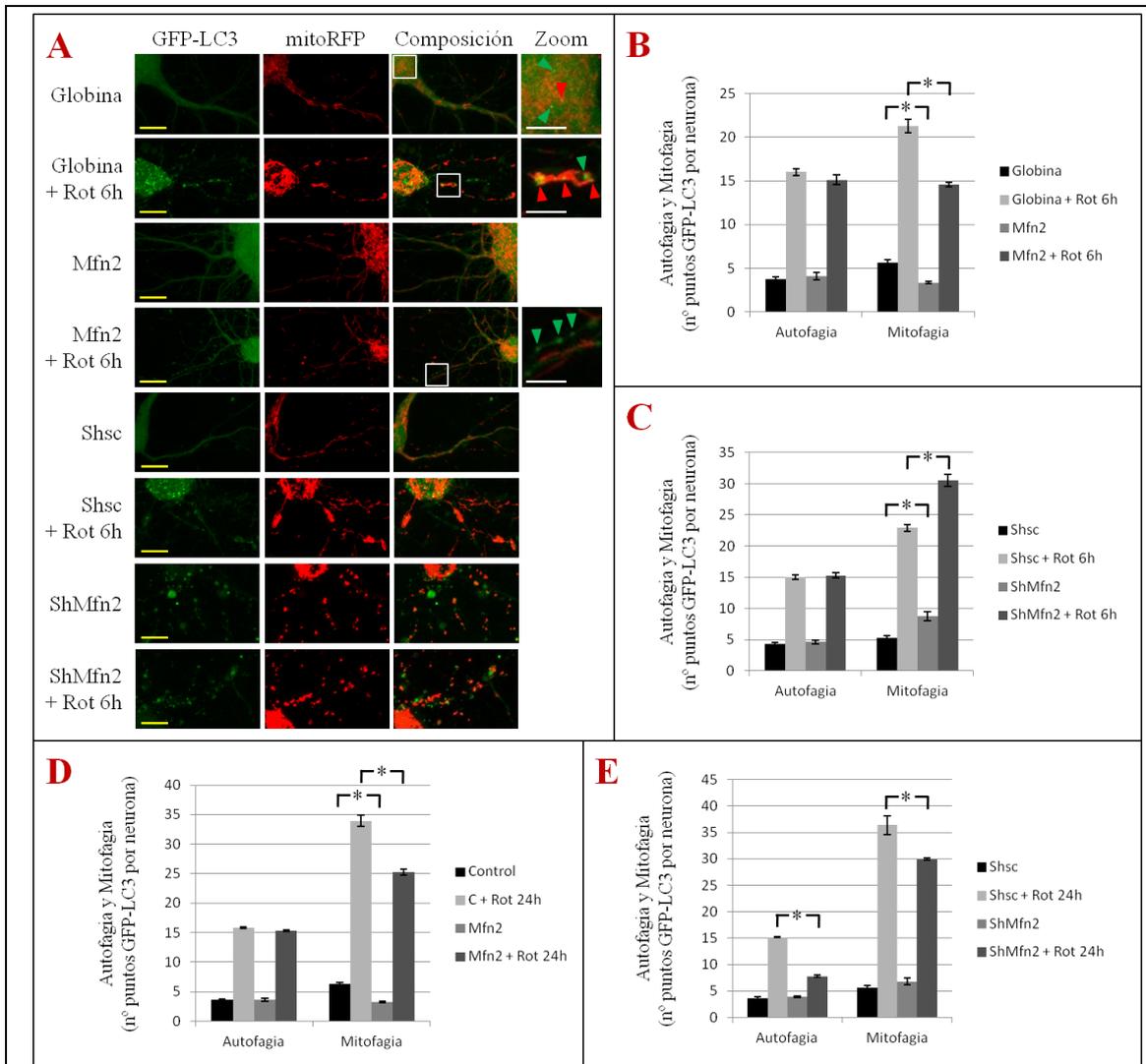
Además de la excitotoxicidad, también hemos analizado otro modelo utilizado para estudiar el Parkinson donde se ha descrito que el tratamiento con Rotenona, un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria, estimula los efectos de la enfermedad y afecta, además, los niveles proteicos de MEF2 (Ryan SD, et al. 2013; Sala G, et al. 2013; Zhu M, et al. 2013). Mediante WB hemos detectado que la aplicación de la Rotenona (0,5  $\mu$ M) promueve una disminución de los niveles proteicos de Mfn2 a tiempos largos (**Figura 59 A**). A nivel de mRNA, los valores de Mfn2 también disminuyen a las 24 horas (**Figura 59 B**).



**Figura 59.** La Rotenona promueve la caída de los niveles de mRNA y proteína de Mfn2. **A)** Western Blot representativo de Mfn2 de neuronas tratadas con Rotenona 10  $\mu$ M durante 6 horas. Western blot repetido una n = 4 experimentos independientes. **B)** Las neuronas corticales fueron tratadas con Rotenona 0,5  $\mu$ M durante los tiempos indicados y los niveles de mRNA de Mfn2 se determinaron con la RT-qPCR. El análisis fue desarrollado con una n = 3 - 4 experimentos independientes. \*p<0,05 comparado con el control, T-test de dos colas. mRNA 18S = Control de carga.

En Parkinson los genes que codifican a PINK1 y Parkin sufren mutaciones que causan la acumulación de mitocondrias dañadas en el citoplasma imposibilitando su eliminación por mitofagia y haciendo que la neurona sea muy susceptible a la apoptosis a través de la vía intrínseca o la acumulación excesiva de ROS (Corti O, et al. 2011). Las neuronas han sido transfectadas con GFP-LC3, mitoRFP y Globina (control) o Mfn2 y Shsc (control) o ShMfn2. El tratamiento con Rotenona (0,5  $\mu$ M) se realizó, en primer lugar, durante 6 horas. Analizamos el aumento del número de autofagosomas y mitofagosomas en microscopía confocal (**Figura 60 A-C**). La sobreexpresión de Mfn2 ha demostrado ser suficiente para frenar significativamente el aumento de la mitofagia mientras que neuronas KD para Mfn2 presentan un aumento sustancial del número de mitofagosomas tanto en la situación control como en las tratadas 6 horas con Rotenona. En ninguna de las situaciones, la autofagia se ha visto modificada de alguna manera. Teniendo en cuenta que la disminución de los niveles de mRNA y de proteína de Mfn2 se da a 24 horas, se analizó qué ocurre a nivel de autofagia. Mediante el mismo tipo de diseño experimental se detectó que al sobreexpresar Mfn2, la formación de autofagosomas no se ha visto alterada aunque aumente ligeramente mientras que la mitofagia se reduce (**Figura 60 D**). Por otro lado, neuronas KD para Mfn2 tratadas con Rotenona (0,5  $\mu$ M) durante 24 horas mostraban una reducción significativa en la formación de autofagosomas (**Figura 60 E**), tal como se ha descrito en otras células KD para Mfn2 (Hailey DW, et al. 2010). Esta disminución podría explicarse teniendo en cuenta que las membranas aisladas que forman los fagosomas son generadas en áreas del retículo endoplasmático muy próximas a las zonas MAM de comunicación con las mitocondrias (Hamasaki M, et al. 2013). Es decir, una reducción en la expresión de Mfn2, la principal molécula conectora entre el ER y las mitocondrias (de Brito

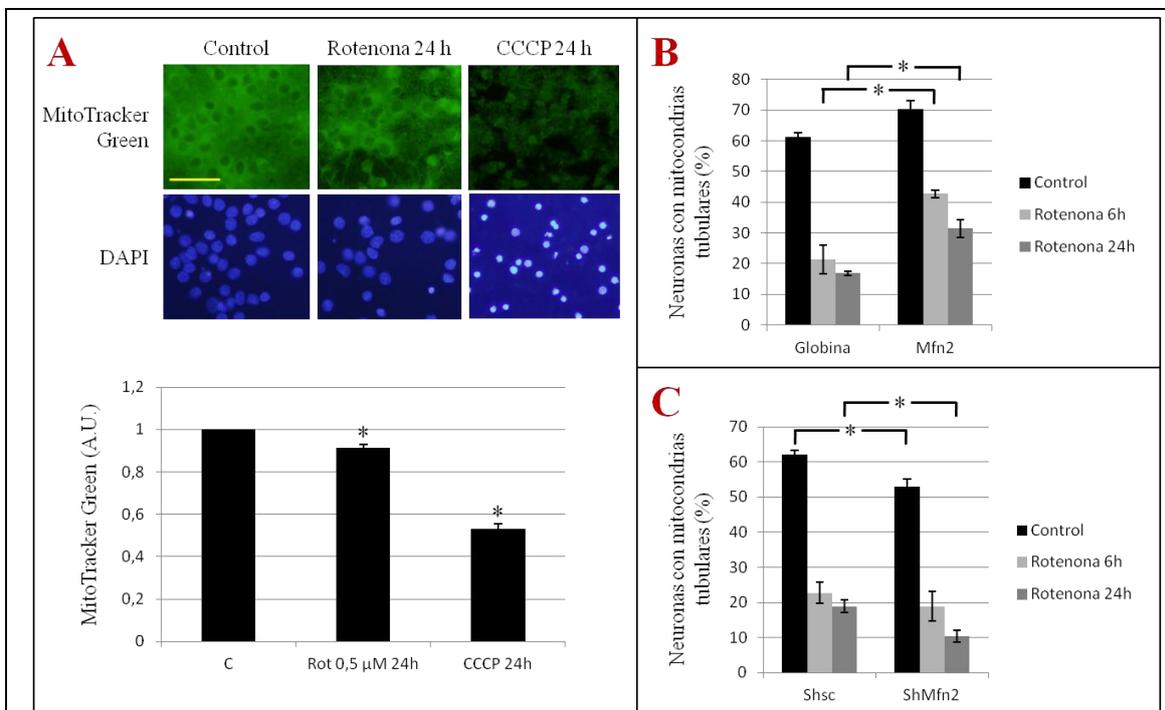
OM & Scorrano L, 2008), genera que ambos orgánulos se separen, empeorando su interacción y comunicación, tal como se ha explicado con anterioridad, y esto provoca que la formación de los fagosomas se vea entorpecida.



**Figura 60.** El aumento de los niveles de Mfn2 protege ante la mitofagia mientras que su caída altera los autofagosomas. **A)** Imágenes representativas de microscopía confocal de neuronas transfectadas con el marcador de mitocondrias mitoRFP, el marcador de mitofagosomas GFP-LC3 y con Globina (control) o Mfn2 o con Shsc (control) o ShMfn2. Las neuronas fueron tratadas durante 6 horas con Rotenona 0,5  $\mu$ M 72 horas después de su transfección. En el zoom se muestra el área cuadrada de la composición con más detalle y se señalan los autofagosomas (puntos verdes señalados por flechas verdes) y los mitofagosomas (puntos amarillentos señalados por flechas rojas). *Barra de escala amarilla = 10  $\mu$ m; blanca = 5  $\mu$ m.* **B)** Análisis de la autofagia y mitofagia en neuronas de (A) transfectadas con mitoRFP, GFP-LC3 y Globina o Mfn2 sometidas al mismo tratamiento que en (A). Se han cuantificado los puntos verdes (autofagia) y los amarillentos (mitofagia) de una n = 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. **C)** Análisis de la autofagia y mitofagia en neuronas de (A) transfectadas con mitoRFP, GFP-LC3 y Shsc o ShMfn2 sometidas al mismo tratamiento que en (A). Se han cuantificado los puntos verdes (autofagia) y los amarillentos (mitofagia) de una n = 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni. **D, E)** Determinación de la formación de auto- y mitofagosomas en las mismas condiciones experimentales pero tratando las neuronas durante 24 horas

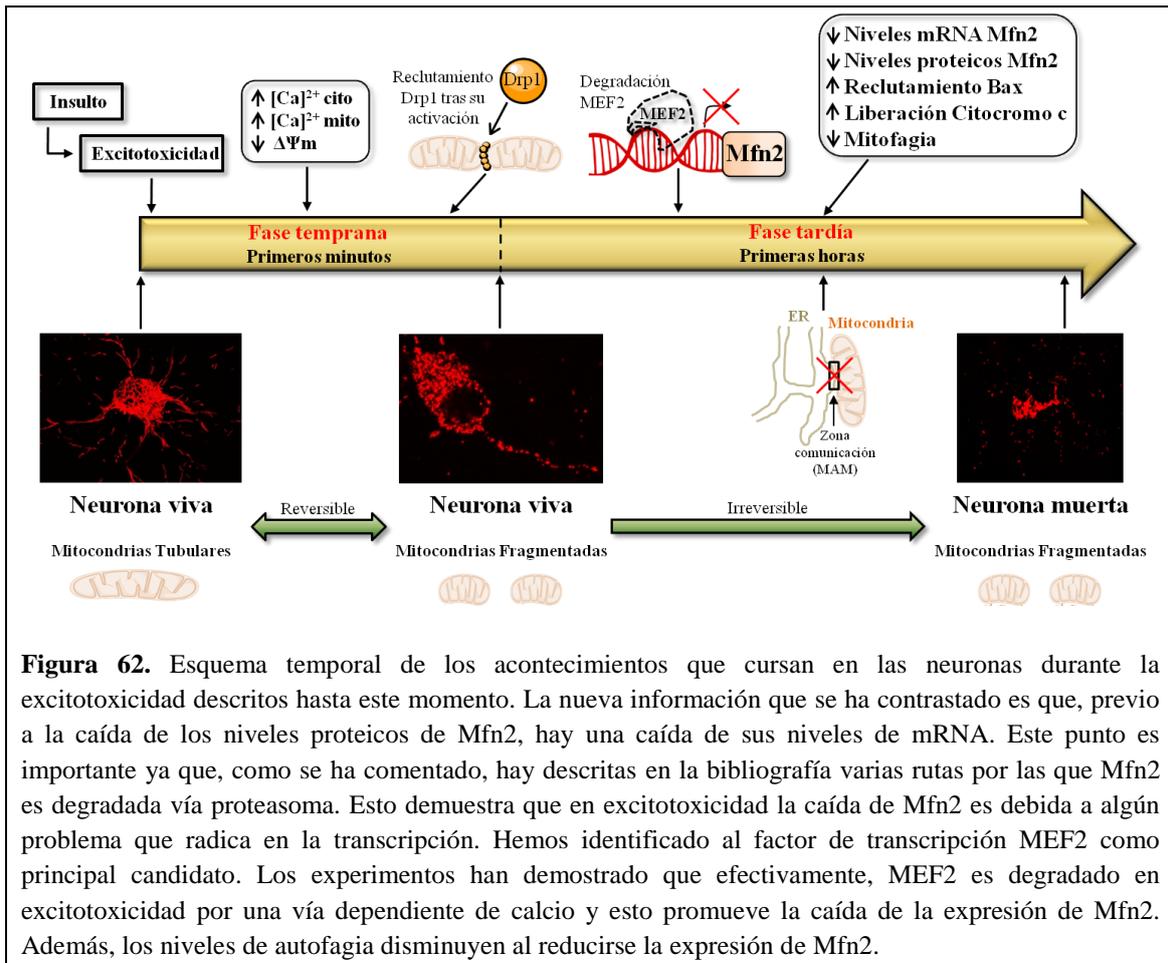
con Rotenona 0,5  $\mu\text{M}$ . Se han cuantificado los puntos verdes (autofagia) y los amarillentos (mitofagia) de una  $n = 3$  experimentos independientes.  $*p < 0,05$  comparado con el control, ANOVA de una vía seguido por el test *post-hoc* de Bonferroni.

Otra aproximación que se ha empleado para medir el aumento de la mitofagia, fue medir la densidad de señal marcando las mitocondrias con *MitoTracker Green* y tratando las neuronas con Rotenona (0,5  $\mu\text{M}$ ) o CCCP (10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas y después fijarlas. Los resultados obtenidos muestran una disminución del volumen de mitocondrias tras el tratamiento con Rotenona en comparación con el control y corregido por el número de células (**Figura 61 A**). Los mismos experimentos los utilizamos para medir la morfología mitocondrial y observamos que la sobreexpresión de Mfn2 protege ante la fragmentación tanto a 6 como a 24 horas de tratamiento con Rotenona (0,5  $\mu\text{M}$ ). Por otro lado, las neuronas KD para Mfn2 mostraron un aumento mayor de la fisión mitocondrial en las neuronas tratadas durante 24 horas coincidiendo con la disminución de los niveles de mRNA y proteicos de Mfn2 (**Figura 61 B, C**).



**Figura 61.** La Rotenona afecta la morfología mitocondrial. **A)** Neuronas tratadas 24 horas con Rotenona (0,5  $\mu\text{M}$ ) o CCCP (10  $\mu\text{M}$ ). Las mitocondrias se han marcado con *MitoTracker Green* (200 nM) y se ha analizado la señal total de cada imagen tomada con el objetivo de 20X del microscopio de fluorescencia dividido por el número de núcleo celulares. Núcleos observados con DAPI. Análisis realizado con una  $n = 5$  imágenes de 3 experimentos independientes.  $*p < 0,05$  comparado con el control, T-test de dos colas. Barra de escala = 5  $\mu\text{m}$ . **B, C)** Determinación del porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares después de 6 y 24 horas de tratamiento con Rotenona (0,5  $\mu\text{M}$ ). Las neuronas fueron transfectadas con mitoRFP y con Globina (control) o Mfn2 o con Shsc (control) o ShMfn2. La morfología mitocondrial se cuantificó con una  $n = 3$  experimentos independientes.  $*p < 0,05$  comparado con el control, T-test de dos colas.

El conjunto de resultados de este apartado, que queda representado en la **Figura 62**, muestra una nueva vía de regulación para Mfn2 en neuronas en excitotoxicidad y también su relevancia en el control de la mitofagia.



**Figura 62.** Esquema temporal de los acontecimientos que cursan en las neuronas durante la excitotoxicidad descritos hasta este momento. La nueva información que se ha contrastado es que, previo a la caída de los niveles proteicos de Mfn2, hay una caída de sus niveles de mRNA. Este punto es importante ya que, como se ha comentado, hay descritas en la bibliografía varias rutas por las que Mfn2 es degradada vía proteasoma. Esto demuestra que en excitotoxicidad la caída de Mfn2 es debida a algún problema que radica en la transcripción. Hemos identificado al factor de transcripción MEF2 como principal candidato. Los experimentos han demostrado que efectivamente, MEF2 es degradado en excitotoxicidad por una vía dependiente de calcio y esto promueve la caída de la expresión de Mfn2. Además, los niveles de autofagia disminuyen al reducirse la expresión de Mfn2.

---

## DESARROLLO DE RATONES KD CONDICIONALES PARA MFN2

Del laboratorio del Dr. Antonio Zorzano nos enviaron unos ratones Mitofusina 2 ( $Mfn2$ )<sup>loxP/loxP</sup> que les fueron proporcionados por David Chan (División de Biología y del Instituto Médico Howard Hughes, Instituto de Tecnología de California, Pasadena, CA) (Chen H, et al. 2007). Los ratones homocigotos ( $Mfn2$ )<sup>loxP/loxP</sup> los cruzaron con un ratón cepa que expresa la recombinasa Cre bajo el control de promotor de MEF2C (MEF2C-73K-Cre) (Heidt AB & Black BL, 2005). Los ratones control y KO eran compañeros de camada. Los ratones fueron mantenidos en un ciclo de 12 h oscuridad/luz y se les proporcionó una dieta estándar de pienso y agua *ad libitum*. Los ratones fueron anestesiados con Hidrato de Clorato 3,5 % para inyectarles NMDA o PBS en la corteza cerebral o el hipocampo. El objetivo de este tratamiento era analizar por inmunohistoquímica los niveles proteicos de Mfn2 comparando los WT con los KO y, por inmunofluorescencia con Fluoro-Jade C, el grado de muerte neuronal en la zona de tratamiento. Nuestra hipótesis era que los ratones KO para Mfn2 presentarían un daño mayor causado por la acción del NMDA frente de los WT, ya que habían descrito que los niveles proteicos de Mfn2 caían, en un extracto proteico total, en un 40 % en dichos ratones KO (Sebastián D, et al. 2011). Lo que se observó fue que en los Western Blot de extracto proteico total de corteza cerebral no se veía ningún cambio en los niveles de Mfn2 a pesar de que sí que se detectó en extracto proteico de músculo esquelético. Con las inmunohistoquímicas se pudo observar que los ratones KO presentaban un marcaje neuronal bastante intenso en la corteza y otras áreas del cerebro mientras que en los WT se marcaban solo las neuritas y axones de forma muy ténue y había mucho *background* en células gliales. Además, los experimentos con Fluoro-Jade C no dieron diferencias entre KO y WT.

Ante estas observaciones se decidió cruzar ratones hembra  $LoxP^{+/+}$  con unos ratones machos Cre recombinasa tamoxifen inducibles. Se ha estado generando la población de interés y actualmente se está expandiendo la colonia para poder volver a realizar los experimentos de muerte neuronal y comprobar si se pueden utilizar para preparar cultivos primarios de neuronas corticales de ratones WT y KO.

---

---

## DISCUSIÓN

---

---

Equiparándolo con una plaga, el ictus es un mal para la salud de la población sin un pesticida adecuado para su eliminación. El único tratamiento aprobado para la isquemia cerebral es el activador tisular del plasminógeno (tPA), que solamente se puede aplicar a un pequeño porcentaje de pacientes (NINDS, 1995). Teniendo en cuenta el enorme impacto socio-económico que tiene esta enfermedad, es importante profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que desencadenen la muerte celular tras la interrupción del flujo sanguíneo en una zona concreta del cerebro. Es necesario evitar que el ictus se convierta en una más de las enfermedades que en 2050 pueden pasar a ser clasificadas de pandemias para la humanidad, como la diabetes, el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, etc. Tras varios años en los que se pensaba que la muerte isquémica era únicamente de tipo necrótica (Brown AW & Brierley JB, 1972), actualmente se tiene la certeza de que en este proceso también participa la apoptosis (Ankarcrona M, et al. 1995; Bonfoco E, et al. 1995; Love S, 2003). Estos hallazgos permitieron definir dos áreas de afectación dentro de la zona afectada por la isquemia. El núcleo o *core* de la patología sufre la falta de nutrientes y oxígeno de forma tan inmediata que la mayoría de células mueren por necrosis; en cambio, el tejido circundante al núcleo, llamada zona de penumbra, contiene células sanas que se debaten entre la vida y la muerte (Lo EH, 2008). Es en esta zona donde se ha descrito que ocurre una muerte de tipo apoptótica que al tratarse de un proceso más lento y regulado, permite una mayor ventana terapéutica.

La isquemia incita el inicio de la excitotoxicidad cuando el glutamato se acumula en la hendidura sináptica y activa de forma reiterada el receptor NMDA. Durante la excitotoxicidad, el glutamato se acumula en el espacio extrasináptico como consecuencia en el falta de energía y el mal funcionamiento de las bombas de iones, así como la falta de mecanismos selectivos de recaptación del glutamato (Choi DW & Rothman SM, 1990). Esto promueve la entrada continua de iones  $Ca^{2+}$  al interior de la neurona activando múltiples vías de señalización dependientes de calcio. Muchas de ellas acaban afectando la funcionalidad y polarización de las mitocondrias iniciando los procesos de muerte celular (Hardingham GE & Bading H, 2003). Las mitocondrias son unos orgánulos que constantemente se están fusionando y fisionando, cambiando de forma y composición. Son transportadas a lo largo del citoesqueleto hacia los puntos donde más se requiere su presencia y es posible que sean la causa directa de muchas enfermedades de índole diversa. Los cambios que se acaecen en la dinámica mitocondrial tienen efectos profundos en la funcionalidad y la viabilidad del orgánulo y, de forma colateral, en la de la propia célula. Por ello, nosotros nos hemos centrado en el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso de apoptosis mediado por la excitotoxicidad y el papel protector de Mfn2.

Nuestro modelo de estudio han sido los cultivos primarios de neuronas de embriones de rata Sprague Dawley (SD) a día de desarrollo 19-20. Basándonos en un protocolo de aislamiento riguroso ya establecido (Banding H and Greenberg ME, 1991) hemos preparado estos cultivos con el fin de estudiar el efecto de la excitotoxicidad sobre los mecanismos moleculares que orquestan la dinámica mitocondrial.

### **La fase temprana de fisión mitocondrial en excitotoxicidad depende de la activación y reclutamiento de Drp1**

En esta Tesis nos hemos centrado en estudiar la dinámica mitocondrial en excitotoxicidad ya que los mecanismos moleculares implicados no se conocen bien (Rintoul GL, et al. 2003; Young KW, et al. 2010; Jahani-Asl A, et al. 2011). Hemos observado que tras un insulto

---

excitotóxico utilizando el agonista NMDA del receptor de NMDA, la gran parte de la fragmentación mitocondrial ocurre durante la primera hora de tratamiento y, a partir de la cuarta hora, hay una segunda progresión de la fragmentación. Estos resultados nos hicieron razonar en que posiblemente hubiese dos fases en el proceso. La primera de ellas y más temprana dependería parcialmente del reclutamiento de Drp1 a la mitocondria. La segunda fase, la más tardía, sería dependiente de Mfn2 y su desregulación a nivel transcripcional. Esta caída de Mfn2 generaría tanto problemas a nivel mitocondrial como la progresión de la apoptosis.

La actividad de fisión de Drp1 es regulada a nivel post-traducciona por una serie de modificaciones que incluyen fosforilación, ubiquitinización, SUMOilación, nitrosilación y O-GlcNAcilación (Otera H, et al. 2013). Hemos intentado analizar todas o gran parte de estas modificaciones con el objetivo de hallar la o las encargadas de activar Drp1 durante esta fase temprana del proceso excitotóxico. Nuestros resultados parecen indicar la posibilidad de que haya un juego de combinaciones entre dos o más modificaciones para activar 100 % a Drp1 en excitotoxicidad. Esta conclusión es sustraída después de que, inhibiendo la SUMOilación, la nitrosilación por el aumento de NO y la fosforilación por ROCK2 con distintos inhibidores o sobrepresando las fosfatasa PGAM5 y la Calcineurina; encontrábamos una recuperación significativa del porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares. Es posible que la activación de Drp1 en excitotoxicidad requiera de un juego de modificaciones seguidas o espaciadas en el tiempo y espacio.

La fragmentación mitocondrial inducida por los donadores de NO es rápido y reversible (Barsoum MJ, et al. 2006). La entrada de calcio a través del receptor NMDA produce la activación de la enzima NO sintasa (nNOS) que se ha implicado en estrés y muerte celular (Sattler R, et al. 1999). Este estrés genera la S-nitrosilación de Drp1 en la Cisteína 644 promoviendo la fisión mitocondrial (Cho DH, et al. 2009). En nuestros resultados encontramos que la inhibición de nNOS bloquea parcialmente la fragmentación inducida por el NMDA. El nivel de inhibición inducido con este mecanismo sobre la fisión es similar al observado cuando se ha utilizado un inhibidor genético y otro farmacológico de Drp1.

El proceso de SUMOilación es muy parecido enzimáticamente al de ubiquitinación. La reacción empieza con la enzima SUMO hidrolasa que proteoliza un grupo SUMO (*small ubiquitin-related modifier*, en inglés). A continuación, una enzima denominada E1 se une al grupo SUMO mediante el consumo de ATP. Este grupo SUMO es transferido a una enzima E2 y, a través de la acción de la enzima E3, la E2 es substituida por el sustrato a ser SUMOilado (Scheschonka A, et al. 2007). En 2013 se publicó que la enzima SENP3, encargada de eliminar los grupos SUMO, favorecía la activación de Drp1, la fragmentación mitocondrial y la muerte celular en isquemia (Guo C, et al. 2013). En nuestros ensayos hemos utilizado un dominante negativo de Ubc9 (Ubc9-DN), la única enzima E2 descrita dentro del proceso de SUMOilación, aumentando así el grado de acoplamiento de grupos SUMO a Drp1. Se ha descrito que la inducción de la SUMOilación es un método de protección en cerebros que han sufrido una isquemia (Lee YJ, et al. 2011; Anderson CA & Blackstone C, 2013), pero en nuestro modelo encontramos que en cultivos primarios de neuronas sometidas a NMDA, el Ubc9-DN incrementaba parcialmente el grado de fusión mitocondrial.

Sin embargo los resultados más significativos son los que apuntan a la fosforilación de Drp1 ya que la sobrepresión de las fosfatasa PGAM5 y Calcineurina protegen ante la fragmentación mitocondrial. Estos resultados han sido contradictorios con lo que se conoce sobre la acción de

---

PGAM5 (Wang Z, et al. 2012) y Calcineurina (Cribbs JT, et al. 2007; Costa V, et al. 2010) en la morfología mitocondrial. A pesar de ello, estos datos se refuerzan con las pruebas realizadas con la enzima ROCK. La isoforma ROCK2 es una quinasa predominante en neuronas (Hashimoto R, et al. 1999; Koch JC, et al. 2014) y algunos de sus sustratos son las endofilinas, el co-activador p300, la proteína Tau, etc (Amano M, et al. 2010). Se ha descrito que ROCK1 fosforila directamente el dominio GED de Drp1, concretamente en la Serina 637, promoviendo la fragmentación mitocondrial (Wang W, et al. 2012). La utilización de dos inhibidores comerciales distintos de ROCK1 y 2 nos ha hecho ver que la fisión mitocondrial se frenaba de forma significativa en comparación con el control. Podemos concluir que la quinasa ROCK2 parece ser un buen candidato para fosforilar y activar a Drp1 en excitotoxicidad. También observamos que el citoesqueleto de tubulina y la correcta expresión de las proteínas Miro es importante para mantener la morfología mitocondrial mientras que el citoesqueleto de actina parece favorecer la fragmentación de las mitocondrias, tal como ya se había descrito (De Vos KJ, et al. 2005). La proteína MAP2, Tau y los neurofilamentos son sustratos específicos para ROCK en neuronas. Su fosforilación por ROCK conlleva la inhibición de su activación y polimerización y puede prevenir la elongación de las neuritas y promover el acortamiento de los microtúbulos y los filamentos intermedios (Amano M, et al. 2003). El mecanismo de fisión es más complicado de lo que se imaginaba hace algunos años. Actualmente se sabe que antes del reclutamiento de Drp1 a la mitocondria, el ER y el citoesqueleto de actina colaboran para constreñir el orgánulo (Klecker T, et al. 2014). Una posible explicación a porqué la sobreexpresión de una forma mutada de Drp1 en la S637 no protegía ante la fragmentación mitocondrial es que ROCK2 podría no estar actuando directamente sobre Drp1, sino sobre el citoesqueleto. Otro motivo podría ser que la enzima que realmente se ha descrito que fosforila a Drp1 es ROCK1 (Wang W, et al. 2012), pero ROCK2 es la forma predominante en neuronas (Hashimoto R, et al. 1999; Koch JC, et al. 2014), por eso nos centramos en su estudio. Vinculado también al movimiento y la fragmentación de las mitocondrias, Miro, una proteína que media la unión de estos orgánulos con las proteínas motoras y Milton (Stowers RS, et al. 2002), está relacionada con la polimerización del citoesqueleto de tubulina ya que la sobreexpresión de Miro 1 y 2 parecen proteger parcialmente ante la fisión mitocondrial.

En relación con algunas enfermedades neurodegenerativas, los niveles de HDAC6, la histona deacetilasa que se encarga de deacetilar la  $\alpha$ -tubulina que compone los microtúbulos, se encuentran aumentados haciendo crecer el porcentaje de microtúbulos acetilados (Ding H, et al. 2008). Parece ser que la acción de HDAC6 conlleva la disrupción del transporte axonal y la utilización del TBA, un inhibidor de la HDAC6, recupera la velocidad y motilidad de las mitocondrias a lo largo de los microtúbulos (Kim C, et al. 2012). Por lo tanto, los microtúbulos acetilados facilitan el transporte. Estas observaciones se complementan perfectamente con el hecho que el proceso de fisión mitocondrial que incluye la participación del retículo endoplasmático, se da también en microtúbulos acetilados (Friedman JR, et al. 2013). El estudio de las HDAC podría ser útil para comprender parte de los experimentos que hemos obtenido con el citoesqueleto y la activación de Drp1 en excitotoxicidad.

Un trabajo interesante que se publicó recientemente, describe la vida mitocondrial basada en su estado mediante una molécula llamada *MitoTimer* (Ferree AW, et al. 2013; Hernandez G, et al. 2013). Esta molécula presenta inicialmente fluorescencia verde que, tras 24 horas, pasa a emitir fluorescencia roja. Es un marcador utilizado para medir el grado de fusión-fisión entre mitocondrias para intercambiar material y también de la propia autofagia para controlar las mitocondrias dañadas. Debido a las características particulares de la estructura de las neuronas,

---

se observó que en el soma había una combinación de fluorescencia amarilla mientras que en las zonas distales predominaba el naranja o el rojo. El reciclado de mitocondrias disfuncionales depende, por tanto, de una correcta regulación del transporte a lo largo del citoesqueleto en neuronas.

En su conjunto, parece evidente aventurarse a afirmar que Drp1 podría estar siendo activada por múltiples modificaciones durante un proceso de excitotoxicidad. Quizás una de ellas sirve para promover su reclutamiento a las mitocondrias mientras que otra la activa para llevar a cabo su función de oligomerización y constreñimiento. Esta hipótesis no sería del todo errónea ya que el reclutamiento de Drp1 por alguno de sus receptores, Fis1, Mff, MiD51 (MIEF1) y MiD49, no deja claro si promueve su activación o simplemente atraen a Drp1 a la mitocondria para que, una vez allí, pueda ser activada por otras enzimas (Losón OC, et al. 2013).

Opa3, una proteína que promueve la fisión mitocondrial por una vía independiente a Drp1 (Ryu SW, et al. 2010) parece no tener ninguna participación en excitotoxicidad ya que no hemos podido reproducir los efectos de Opa3 descritos en células HeLa y COS-7 sobre la dinámica mitocondrial en nuestro modelo de trabajo con neuronas. De todos modos, hay varios trabajos centrados en el estudio de varios factores celulares que podrían promover la fisión, aparte de Opa3, de forma independiente a Drp1. MTP18 es una proteína de la membrana interna de las mitocondrias. Su función parece estar asociada con la fisión de dicha membrana interna sin requerir la actuación de Drp1 (Tondera D, et al. 2004). Por otro lado, hay un ejemplo de fragmentación mitocondrial promovida por un agente exógeno, como es la toxina LLO de *Listeria monocytogenes* (Stavru F, et al. 2013). Este terreno está poco explorado pero se van detectando nuevos posibles candidatos.

### **La reducción de los niveles proteicos de Mfn2 genera la fragmentación mitocondrial de la fase tardía de la excitotoxicidad**

Se ha descrito que el glutamato y el óxido nítrico promueven fisión y este efecto puede ser revertido una vez el estímulo a cesado (Rintoul GL, et al. 2003; Barsoum MJ, et al. 2006). En nuestro modelo experimental observamos que en excitotoxicidad el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares vuelve a disminuir a pesar que el estímulo haya sido frenado.

Por este motivo nos centramos en analizar los valores proteicos de las cuatro proteínas principales que intervienen en la regulación de la dinámica mitocondrial para describir que ocurre durante la fase tardía de la excitotoxicidad. Nuestros resultados de Western Blot realizados *in vitro* en neuronas sometidas al NMDA y al modelo de hipoxia (OGD) e *in vivo* en ratas sometidas a MCAO, desvelan que Drp1 sufre una pequeña caída inicial (15 – 20 %) en sus niveles de proteína y se mantiene a lo largo de todo el tiempo que dura el tratamiento. Por ensayos de inmunofluorescencia hemos detectado que Drp1 es reclutada a las mitocondrias casi por completo durante la primera hora de tratamiento con NMDA. En su conjunto, los experimentos de Western Blot y microscopía nos hacen deducir que los niveles proteicos de Drp1 no son tan importantes, lo imprescindible es su localización celular.

Opa1 es la proteína encargada de fusionar las membranas internas de las mitocondrias. Su regulación depende de la activación de varios tipos de proteasas ubicadas también en la membrana interna que dependen del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y promueven

---

la fisión (Ishihara N, et al. 2006; Griparic L, et al. 2007). En nuestro modelo *in vitro* e *in vivo* no detectamos ningún cambio proteico en la proporción entre la forma corta y larga de Opa1 en excitotoxicidad a pesar de que en excitotoxicidad también hay una caída del  $\Delta\Psi_m$ . El procesamiento de Opa1 es distinto al de las proteínas de la membrana externa de las mitocondrias.

Nuestros datos también indican que Mfn2 interviene en una fase tardía de la fragmentación mitocondrial en excitotoxicidad. Las muestras de proteína *in vitro* e *in vivo* mostraron una caída en la expresión de Mfn2 sin detectarse cambios a nivel de Mfn1. Durante la realización de este trabajo, han aparecido dos trabajos que hablan de la regulación de Mfn2 en excitotoxicidad. El primero habla de cultivos primarios de neuronas de rata sometidas a 3 horas de OGD también muestran una caída de Mfn2 a nivel proteico sin cambios aparentes en Opa1 y una ligera subida de la expresión de Mfn1 (Wapperler EA, et al. 2013). En el segundo de ellos hablan de un estudio *in vivo* donde se detecta una reducción de la expresión de Mfn2 y de Opa1 en ratones sometidos a MCAO (Kumari S, et al. 2012). Además comprobamos que los valores proteicos de Mfn2 caían de todos modos tras dejar el cultivo recuperarse al retirar el NMDA. Desarrollamos una forma ShRNA para Mfn2 para obtener neuronas KD para Mfn2 donde comprobamos que también se observaba la caída en los niveles proteicos de Mfn2 y se aumentaba el porcentaje de fragmentación mitocondrial.

### **Mfn2 es un factor importante en la homeóstasis del $Ca^{2+}$ y la viabilidad neuronal**

Mfn1 es una proteína GTPasa muy buena en ejecutar la fusión entre dos mitocondrias, de hecho mejor que Mfn2 (Ishihara N, et al. 2004). De todos modos, análisis de ratones KO para Mfn1 y Mfn2 indican que tienen funciones redundantes y distintas (Chen H, et al. 2003, 2007). De hecho, la pérdida de Mfn2 tiene un mayor impacto en la viabilidad neuronal que Mfn1. Como ejemplos a remarcar cabría mencionar que mutaciones en Mfn2 causa defectos en la movilidad mitocondrial y la fusión mitocondrial y es la principal causa de sufrir la enfermedad neurodegenerativa Charcot-Marie-Tooth type 2A (CMT2A) (Züchner S & Vance JM, 2006; Baloh RH, et al. 2007). Mfn2 es requerida para el desarrollo postnatal del cerebelo (Chen H, et al. 2007) y neuronas dopaminérgicas condicionales han mostrado que Mfn2 y no Mfn1, es esencial para las proyecciones estriatales y el buen funcionamiento del circuito nigroestriatal (Lee S, et al. 2012; Pham AH, et al. 2012).

Nuestros resultados han mostrado que neuronas KD para Mfn2 expresan niveles de esta proteína muy similares a los inducidos en excitotoxicidad e impiden el correcto funcionamiento de las mitocondrias. Independientemente de su actividad en la fusión, la represión de Mfn2 en los microtubos altera el metabolismo oxidativo y el potencial de membrana mitocondrial al regular la expresión de algunas de las subunidades OXPOS de los complejos I, II, III y V (Bach D, et al. 2003; Pich S, et al. 2005; Segales J, et al. 2013). Las mitocondrias juegan un papel fundamental en la regulación de la homeostasis del calcio. En excitotoxicidad, hay una entrada masiva de iones  $Ca^{2+}$  al interior de la neurona. La importación de este calcio a la matriz mitocondrial es mediada por el transportador MCU que es regulado por el potencial de membrana. La captación de calcio utiliza la fuerza protónica compitiendo con la ATPsintasa. Además, la activación de la ATPasa dependiente de calcio que se utiliza para eliminar calcio del citosol, causa una demanda de energía adicional a la neurona (Nicholls DG, 2009). Nuestros resultados muestran que neuronas KD para Mfn2 presentan una caída exacerbada del  $\Delta\Psi_m$  en comparación con el control. Unas neuronas deficientes a nivel de  $\Delta\Psi_m$ , denotan fallos en la capacidad respiratoria

---

de las mitocondrias (Brand MD & Nicholls DG, 2011). Hemos calculado el ratio de control respiratorio (RCR, por sus siglas en inglés) y la capacidad respiratoria disponible en neuronas KD para Mfn2 y hemos observado que ambos valores se encuentran disminuidos.

Por lo que al calcio se refiere, nuestros resultados muestran una vinculación directa de Mfn2 con el buen funcionamiento de las mitocondrias como tamponadoras. El aumento de calcio citoplasmático incitado durante la excitotoxicidad es capturado por varios orgánulos celulares, como el retículo endoplasmático (ER) y las mitocondrias. En neuronas KD para Mfn2 hemos medido los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y parece que no aumentan tanto como en las neuronas control mientras que el calcio citoplasmático parece aumentar más en las KD ya que estas mitocondrias no son capaces de tamponar el  $\text{Ca}^{2+}$  con tanta eficiencia. La correcta comunicación entre las mitocondrias y el ER es importante en la regulación del calcio (Hayashi T, et al. 2009) y Mfn2 cumple un papel destacado como puente de unión entre ambos orgánulos (de Brito OM & Scorrano L, 2008). Nuestros resultados muestran que la excitotoxicidad genera la separación física de ambos orgánulos al disminuir los niveles proteicos de Mfn2 a partir de la fase tardía de fragmentación mitocondrial. En su conjunto, todos estos datos parecen indicar que si la expresión de Mfn2 disminuye e impide la buena comunicación entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias, la captación o tamponamiento del calcio por parte de las mitocondrias mediante el transportador *uniporter* MCU, se ve perjudicada porque disminuyen las zonas MAM. Además, recientemente se ha descrito que la sobreexpresión de MCU ayuda a prevenir el incremento de la muerte neuronal ante la excitotoxicidad (Qiu J, et al. 2013). A consecuencia del aumento del calcio citoplasmático por las condiciones recién nombradas, hemos detectado que la proteasa Calpaína se activa al unirse al calcio (Khorchid A & Ikura M, 2002) promoviendo el proceso de sus dianas, entre ellas la espectrina.

Como se ha comentado, tras producirse un ictus se generan dos zonas en el cerebro diferenciadas porque en el núcleo de la afeción las neuronas mueren de forma rápida por necrosis mientras que en el tejido circundante, llamado penumbra, las neuronas pueden morir por apoptosis (Lo EH, 2008). Estas neuronas de la zona de penumbra quedan sensibilizadas a vías de muerte tardías de una forma que depende del funcionamiento de las mitocondrias (Ankarcrona M, et al. 1995; Luetjens CM, et al. 2000; D'Orsi B, et al. 2012). Mfn2 parece estar participando en una fase tardía de muerte celular y se ha descrito que interactúa con Bax en la mitocondria (Karbowski M, et al. 2002; Neuspiel M, et al. 2005) y puede interferir su reclutamiento y ensamblaje con Bak para evitar la formación del PTP y la subsiguiente liberación del citocromo c (Sugioka R, et al. 2004; Neuspiel M, et al. 2005). En nuestro modelo experimental con cultivos primarios de neuronas hemos observado que la sobreexpresión de Mfn2 no protege a tiempos largos cuando inducimos necrosis pero si que parece ser suficiente para frenar el reclutamiento de Bax a la mitocondria y también para evitar la liberación del citocromo c al citosol deteniendo así la progresión de la apoptosis.

El mecanismo preciso con el que Mfn2 interfiere con la activación de Bax no se conoce. Una posibilidad es que la pérdida de Mfn2 facilite la remodelación de la membrana externa de las mitocondrias por Drp1 estimulando la oligomerización de Bax (Montessuit S, et al. 2010). Mfn2 interactúa con distintos miembros de la familia Bcl-2, tanto las anti- como las pro-apoptóticas (Suen DF, et al. 2008). Se podría especular la posibilidad que cambiando los niveles de Mfn2 se afecta el equilibrio entre las proteínas Bcl-2 pro- y anti-apoptóticas a favor de Bax y la consecuente formación del MOMP.

---

Hemos desarrollado por clonación una construcción que expresa los aa 392-602 de Mfn2, el dominio que se sospecha que podría interactuar con Bax (Karbowski M, et al. 2006). Tras transfectarlo en neuronas corticales y someter el cultivo a ciertos estímulos apoptóticos, hemos observado que promueve cierta protección en alguna de las condiciones por lo que hace al porcentaje de Bax reclutada a la mitocondria. Como nuestra construcción parece tener una localización citosólica, creemos que el efecto está subestimado. Se seguirá trabajando en ello para conseguir su localización en las mitocondrias y comprobar realmente si interactúa con Bax y protege las neuronas ante la apoptosis.

### **Mfn2 es regulada a nivel transcripcional en excitotoxicidad**

Las proteínas de la membrana externa de las mitocondrias son procesadas, generalmente, vía proteasoma. Hasta el momento, se conocen por lo menos 3 vías enzimáticas distintas que incluyen la ubiquitinación de Mfn2 y su degradación por el proteasoma. La más conocida de ellas es la mediada por PINK1 y Parkin (Tanaka A, et al. 2010; Chan NC, et al. 2011) donde recientemente se ha descrito que para la buena activación de Parkin, se requiere que PINK1 fosforile las proteínas pertinentes a ser eliminadas pero también las propias ubiquitininas (Kane LA, et al. 2014). La E3 ligasa MARCH-V es la única descrita hasta el momento que interactúa con Mfn2 pero no promueve su eliminación vía proteasoma, todo lo contrario, parece aumentar la fusión mitocondrial al ubiquitinar a Drp1 para su degradación (Nakamura N, et al. 2006). Otra de las vías enzimáticas descritas es la dependiente de la E3 ligasa Huwe1 que es activada cuando, en condiciones de estrés, JNK fosforila a Mfn2 en la Serina 27 (Leboucher GP, et al. 2012). A pesar de todas las evidencias presentes durante la excitotoxicidad y la caída del potencial de membrana mitocondrial que promueve la activación de JNK (Borsello T, et al. 2003; Soriano FX, et al. 2006b, 2008; Nicholls DG, 2009), la reducción en los niveles proteicos de Mfn2 que detectamos tanto *in vitro* como *in vivo* no puede bloquearse al utilizarse el MG-132, un inhibidor específico del proteasoma. Para poder descartar esta vía de forma definitiva, comprobamos que bloqueando el proteasoma, el total de proteínas ubiquitinizadas se acumulaba y, además, en otro experimento despolarizamos las mitocondrias con CCCP y vimos que los niveles proteicos de Mfn2 caían pero al utilizar MG-132 se evitaba.

Hasta el momento hay pocos factores descritos que promuevan o inhiban la expresión de Mfn2 mediante su interacción directa con el promotor. De los ejemplos disponibles, cabe mencionar a p53, ya que su sobreexpresión aumenta la transcripción de Mfn2 y su silenciamiento produce el efecto contrario (Wang W, et al. 2010). A pesar de lo interesante de la interacción de Mfn2 con un factor tan importante y vinculado al cáncer como p53, no hay muchos más datos al respecto. Otro factor destacado es la enzima ALCAT1 que parece regular negativamente la expresión de Mfn2 reduciéndola en un 50 % (Li J, et al. 2012). También se ha descrito a implicación del factor de transcripción Sp1 y se ha identificado la región exacta del promotor de Mfn2 que reconoce y regula (Soriano E, et al. 2012). Por otro lado está el PGC-1 $\alpha$  y su relevancia en la diabetes tipo 2 (Soriano FX, et al. 2006a) y la promoción de la supervivencia neuronal (Chen SD, et al. 2011) y el PPAR $\delta$  en el miocardio (Li Y, et al. 2009). La mayoría de los procesos de regulación transcripcional de Mfn2 están vinculados directamente en su regulación positiva y, por tanto, en promover la supervivencia celular.

Hay evidencias que demuestran que durante la excitotoxicidad hay cambios en los programas transcripcionales de la célula (Zhang SJ, et al. 2007; Cook DJ, et al. 2012). Mediante RT-qPCR

---

comprobamos que los niveles de mRNA de Mfn2 en neuronas tratadas con NMDA sufrían unos efectos que correlacionaban perfectamente con lo que se observaba a nivel proteico. A las 4 horas de tratamiento el mRNA caía en ambos modelos *in vitro*. Tal como se ha comentado con anterioridad, la excitotoxicidad lleva a la activación de diferentes tipos de proteasas dependientes de calcio. Para comprobar si la acción de alguna de ellas era la responsable de disminuir los niveles proteicos de Mfn2, tratamos las neuronas con Actinomicina D (un inhibidor de la transcripción) y Ciclohexamina (un inhibidor de la traducción). Ambos inhibidores reducían los niveles de Mfn2 pero estos no se veían incrementados al utilizar NMDA. Es interesante mencionar que un análisis de una *microarray* ha demostrado que los niveles de mRNA de Mfn2 caen en más de un 50 % en neuronas de rata de la zona de penumbra sometidas a MCAO (Ramos-Cejudo J, et al. 2012). Todo en su conjunto demuestra, por tanto, que Mfn2 es una proteína regulada a nivel transcripcional en excitotoxicidad.

### **La regulación a nivel transcripcional de Mfn2 en excitotoxicidad depende de MEF2**

MEF2 se ha descrito como un factor de transcripción muy abundante en músculo y reconoce secuencias homo- o heterodiméricas ricas en A/T (Black BL & Olson EN, 1998). Aunque la expresión de MEF2 es elevada en músculo, también lo es en neuronas y en menor medida en otros tipos celulares. En vertebrados existen 4 genes MEF2: A, B, C y D con patrones de expresión diferentes, pero solapados, a lo largo del desarrollo embrionario y en los tejidos adultos. El calcio, a través de su acción sobre proteínas fosfatasa y proteínas quinasas, modifican a MEF2 y regulan su actividad transcripcional (McKinsey TA, et al. 2002). La primera evidencia de que MEF2 podía regular la expresión codificantes para proteínas mitocondriales provino del promotor de las subunidades de citocromo oxidasa específicas de músculo que carecen de cajas de unión a NRF, pero dependen de MEF2 para su expresión (Wan B & Moreadith RW, 1995). El ratón deficiente en MEF2A sufre letalidad perinatal y aquellos ratones que llegan a la edad adulta muestran una reducción en el número de mitocondrias y de mtDNA (Naya FJ, et al. 2002). La represión de la expresión de MEF2 por medio de la HDAC provoca la disminución de mitocondrias y de la expresión de proteínas mitocondriales así como del regulador de la biogénesis mitocondrial PGA-1 $\alpha$  (Czubryt MP, et al. 2003).

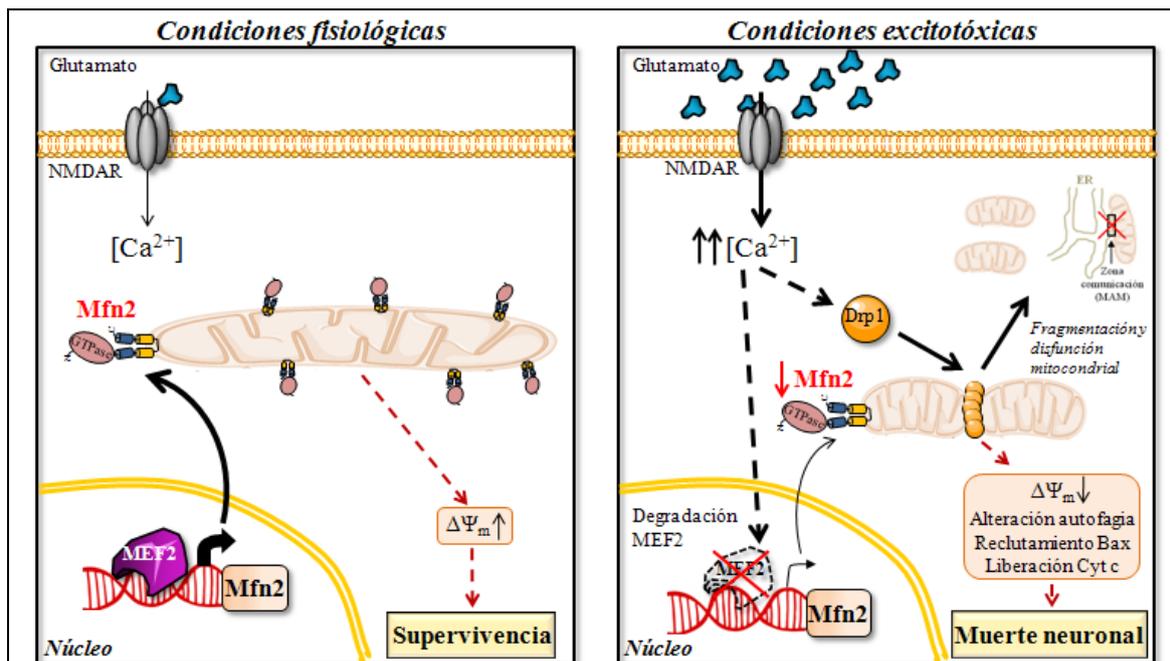
MEF2 juega un papel central en el desarrollo del cerebro, la formación de sinapsis y la supervivencia neuronal (Mao Z, et al. 1999; Li M, et al. 2001; Okamoto S-I, et al. 2002). Desde hace algunos años que se conoce el programa genético que regula MEF2 vinculado a la remodelación sináptica (Flavell SW, et al. 2008). Nuestros experimentos han demostrado que en excitotoxicidad, los valores proteicos de MEF2 caen de forma drástica tanto *in vitro* como *in vivo* dentro de una escala temporal que correlaciona con la posterior caída del mRNA y la proteína de Mfn2. La activación de la Calpaína u otras proteasas podrían estar llevando a cabo la proteólisis de MEF2 (Smith PD, et al. 2006). La acción de la Calpaína y posterior corte de MEF2 también se ha vinculado a la activación de los NMDAR extrasinápticos (Wei G, et al. 2012). Estas observaciones proporcionan un vínculo directo entre NMDAR y la supresión de la maquinaria de supervivencia neuronal, lo que sugiere que la inhibición de factor de supervivencia MEF2D es consecuencia de la excitotoxicidad promovida por el NMDAR. En nuestro modelo hemos utilizado la combinación de un inhibidor de la Calpaína y otro de las caspasas y comprobamos que, efectivamente, se evitaba la caída de los niveles proteicos de MEF2 y, además, se mejoraba significativamente el porcentaje de neuronas con mitocondrias tubulares a tiempos cortos. De todos modos, hay que tener en cuenta que las caspasas se han

identificado que después de generarse el PTP, pueden acceder al espacio intermembranal de las mitocondrias alterando su funcionamiento (Ricci JE, et al. 2004).

Para profundizar en el papel de MEF2 en la regulación de Mfn2, creamos una forma dominante negativo de MEF2 (MEF2-DN) que puede unirse al ADN pero no puede iniciar la transcripción por no poseer el dominio de transactivación. Con esta construcción observamos que las neuronas transfectadas presentaban unos niveles proteicos y de mRNA muy similares a los obtenidos con el tratamiento de NMDA. Además, el efecto dañino del MEF2-DN sobre la morfología mitocondrial, el potencial de membrana y la viabilidad neuronal, eran recuperados parcial- o totalmente al sobreexpresar Mfn2 de forma exógena.

Otros experimentos que han sido desarrollados por el Dr. Francesc X. Soriano demuestran que el factor de transcripción MEF2 regula la transcripción basal de Mfn2 en neuronas y que la degradación de MEF2 a consecuencia de la excitotoxicidad (Li M, et al. 2001; Okamoto S-I, et al. 2002) resulta en la caída en la expresión de Mfn2 a nivel transcripcional. Estos experimentos pueden consultarse en la Figura 8 y la Figura S8 del Artículo publicado en la revista EMBO (ANEXO 2).

En la **Figura 63** se muestra un resumen de los resultados obtenidos y los conceptos generales.



**Figura 63** Modelo propuesto para comprender los cambios acaecidos en la morfología mitocondrial y la vulnerabilidad neuronas en condiciones de excitotoxicidad. Bajo condiciones fisiológicas, MEF2 se une al promotor de Mfn2 y regula su expresión génica basal resultando en una morfología mitocondrial de aspecto tubular. En condiciones de excitotoxicidad, Drp1 es activada y reclutada a la mitocondria y promueve una rápida, pero reversible, fisión. El aumento de los niveles de calcio citoplasmático producen la degradación de MEF2 y la expresión génica de Mfn2 cae, produciendo un efecto tardío en el tiempo sobre la morfología mitocondrial. Una baja expresión de Mfn2 promueve disfunciones a nivel mitocondrial, que causan problemas en la homeostasis del calcio, facilita el reclutamiento de Bax a la mitocondria, la liberación del Citocromo c al citoplasma y aumento de la muerte celular tardía en excitotoxicidad.

---

## **Mfn2 es un factor importante en la regulación de la autofagia**

La autofagia es un sistema de degradación lisosomal utilizado por la célula para reciclar constituyentes obsoletos y eliminar orgánulos dañados y agregados proteicos. El objetivo del proceso es suplir la demanda energética debida a la privación de nutrientes, pero también se ha asociado con los procesos fisiológicos así como patológicos tales como el desarrollo, la diferenciación, las enfermedades neurodegenerativas, el estrés, las infecciones y el cáncer (Levine B & Kroemer G, 2008). Durante la falta de nutrientes, la función de la autofagia es un mecanismo de supervivencia; sin embargo, una autofagia excesiva puede conducir a la muerte celular vía un proceso morfológicamente distinto al de la apoptosis (Mizushima N & Komatsu M, 2011).

Debido a que las neuronas presentan largas prolongaciones dendríticas y el axón que amplían notablemente su superficie, son unas células que se enfrentan a una regulación severa de la autofagia ya que los orgánulos disfuncionales y los desechos celulares pueden acumularse en la neurona durante toda su vida ya que no se dividen. La forma de abordar eficientemente este mecanismo es mantener un buen movimiento bi-direccional. A pesar de las grandes distancias, las vacuolas autofágicas generadas en los axones o en las dendritas son dirigidas hacia el cuerpo neuronal donde se encuentran los lisosomas (Lee S, et al. 2011). Por lo tanto, cualquier problema relacionado con el transporte a lo largo del citoesqueleto o en la regulación de la propia autofagia, genera acumulaciones de proteínas y orgánulos dañados en la célula promoviendo la degeneración neuronal (Komatsu M, et al. 2006).

Las mitocondrias en los cardiomiocitos están altamente organizadas y se sitúan en el aparato contráctil (sarcómero) al lado de los túbulos T, directamente debajo del sarcolema y son muy importantes para cubrir las necesidades energéticas de las células (Bing R, et al. 1954; Hom J, et al. 2010). Mfn2 es una proteína abundante en el corazón en comparación con otros tejidos (Santel A, et al. 2003). Se ha descrito que Mfn2 desempeña múltiples funciones en la regulación del metabolismo celular, la estabilidad del ADN mitocondrial, la proliferación y la supervivencia celular y la muerte en células cardíacas (Shen T, et al. 2007). Además, hay evidencias que apuntan que Mfn2 es importante en la regulación de la autofagia en células cardíacas, es más, la caída de la expresión de Mfn2 ante una señal de estrés producida por isquemia contribuye a la activación de la autofagia (Zhao T, et al. 2012). Encontraron que la eliminación específica de Mfn2 en cardiomiocitos causaba grandes acumulaciones de autofagosomas. En particular, la fusión entre los autofagosomas con los lisosomas, un paso crítico en la degradación de la autofagia, se retrasaba notablemente sin alterar la formación de los propios autofagosomas y lisosomas en respuesta al estrés generado en una isquemia. Estos estudios muestran el papel de Mfn2 en la regulación de la autofagia en células cardíacas donde se implican las mitocondrias y la formación de los autofagosomas. En neuronas, por el contrario, hay pocas evidencias sobre la regulación de la autofagia mediada por Mfn2.

La relación entre la autofagia y la muerte celular no está muy clara (Baehrecke EH, 2005; Galluzzi L, et al. 2012). Muy recientemente se demostró que los autofagosomas se forman en los puntos de contacto entre las mitocondrias y el ER, es decir, en las zonas MAM (Hamasaki M, et al. 2013). En términos generales se conoce que la autofagia constituye una respuesta protectora activada por las células en un intento de hacer frente al estrés (Galluzzi L, et al. 2012), a pesar de ello, se ha descrito muerte celular con y por la autofagia en cerebros de isquemia focal (Puyal J, et al. 2009, 2013). Nuestros resultados con Rotenona, un inhibidor del

---

complejo I de la cadena respiratoria utilizado en células modelo de Parkinson (Ryan SD, et al. 2013), muestran que los niveles proteicos y de mRNA de Mfn2 disminuyen en neuronas a tiempos largos (24 horas). Se ha descrito que fibroblastos KO para Mfn2 presentan unos niveles de autofagia reducidos ante la respuesta del estrés del ER (Muñoz JP, et al. 2013), igual que en otros tipos celulares (Hailey DW, et al. 2010).

El mecanismo de la autofagia comporta la actuación de la proteína LC3 y p62 para conseguir que los autofagosomas localicen zonas del citoplasma, conjunto de proteínas diana o mitocondrias para ser eliminadas (Nixon RA, 2013). Las dianas reconocidas por esta maquinaria son las que han sido ubiquitinizadas, generalmente, mediante la actuación de Parkin y PINK1 en el caso de la mitofagia (Geisler S, et al. 2010). Recientemente se ha descrito que Mfn2 podría facilitar el reclutamiento de Parkin a la mitocondria (Chen Y & Dorn II GW, 2013), demostrando el papel destacado de Mfn2 en la regulación de la mitofagia. En cultivos primarios de neuronas corticales hemos observado que al sobreexpresar Mfn2 se genera una cierta protección disminuyendo la mitofagia promovida por la Rotenona, mientras que neuronas KD para Mfn2 presentaban un aumento de la mitofagia a tiempos cortos (6 horas) que no se repite a tiempos largos (24 horas). Además, a tiempos largos también hemos detectado una disminución del número de autofagosomas en neuronas KD para Mfn2 teniendo en cuenta que Mfn2 es la encargada de facilitar y unir físicamente ambos orgánulos facilitando la autofagia (de Brito OM & Scorrano L, 2008).

Como resumen final, en excitotoxicidad hemos diferenciado una fase temprana y reversible de fragmentación mitocondrial dependiente de la activación y reclutamiento de Drp1 seguida de otra tardía e irreversible donde los niveles tanto de mRNA como de proteína de Mfn2 disminuyen y esta regulación es llevada a cabo por MEF2 a nivel transcripcional. La reducción de los niveles de Mfn2 sensibiliza a la neurona a la pérdida del  $\Delta\Psi_m$ , a problemas respiratorios, a un aumento del calcio mitocondrial y del citoplasmático, a una pérdida de comunicación entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático, lo que comporta una mayor activación de las proteasas Calpaína, y sensibiliza las neuronas a la apoptosis.

---

---

## CONCLUSIONES

---

- 
1. Hemos observado que durante la excitotoxicidad ocurren dos fases de fragmentación mitocondrial, una temprana reversible y otra tardía irreversible.
  2. La fase temprana de fisión mitocondrial en excitotoxicidad depende de la activación y el reclutamiento de Drp1. En la activación de Drp1 parecen estar participando distintos tipos de modificaciones post-traduccionales como la SUMOilación, la nitrosilación y la fosforilación. El citoesqueleto de actina también juega un papel destacado en la progresión de la fragmentación mitocondrial durante la fase temprana de la excitotoxicidad.
  3. Los cambios morfológicos en la fragmentación mitocondrial durante la fase tardía de la excitotoxicidad dependen de la disminución en los niveles proteicos de Mfn2. Esta reducción de Mfn2 ha sido validada en dos modelos *in vitro* de excitotoxicidad utilizando el agonista NMDA y el modelo OGD (hipoxia), e *in vivo* en un modelo de MCAO con ratas. Además, Mfn2 interviene en dicha fase tardía de fragmentación que se ha demostrado ser irreversible ya que la eliminación del NMDA del medio y posterior recuperación durante algunas horas no han evitado la segunda fisión mitocondrial ni la disminución de los niveles proteicos de Mfn2 a la cuarta hora.
  4. En neuronas corticales Mfn2 es importante para mantener una correcta comunicación entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático, lo que favorece la captación y tamponamiento del  $Ca^{2+}$  mejorando su homeóstasis igual que el buen funcionamiento de las mitocondrias.
  5. La disminución de la expresión de Mfn2 incrementa la muerte neuronal en excitotoxicidad mediante el reclutamiento de Bax a la mitocondria.
  6. Mfn2 es regulada por MEF2 a nivel transcripcional en excitotoxicidad. Esto aporta una nueva evidencia del papel del factor de transcripción MEF2 en la promoción de la supervivencia en neuronas.
  7. La sobreexpresión de Mfn2 disminuye la mitofagia mientras que su reducción la promueven y alteran la autofagia.

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

---

## LIBROS CONSULTADOS

Bill Bryson (2003) *Una breve historia de casi todo*. RBA Libros, S. A. Barcelona.

Charles Van Doren (1991) *Breve historia del saber*. Editorial Planeta, S. A. Barcelona.

Harvey Lodish, et al. (2005) *Molecular Cell Biology*, Fifth Edition. Editoria Médica Panamericana, S. A. Madrid.

Jaques Monod (1981) *El azar y la necesidad*. Editorial Tusquets, S. A. Barcelona.

Joan Montaner (2008) *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. Editorial Marge Books, S. A. Barcelona.

José Marín-García (2005) *Mitochondria and the Heart*. Editorial Springer.

Lynn Margulis (1970) *Origin of eukaryotic cells*. Yale University Press, New Haven, CT.

Lynn Margulis & Dorian Sagan (2003) *Captando genomas*. Editorial Kairós, S. A. Barcelona.

Patricia Fara (2009) *Breve historia de la ciencia*. Editorial Ariel, S. A. Barcelona.

Richard Altmann (1890) *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Veit, Leipzig.

---

## ARTÍCULOS CONSULTADOS

- Abou-Sleiman PM, et al. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 7:207-219.
- Alexander C, et al. (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*, 26:211-215.
- Amano M, et al. (2003) Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *J Neurochem*, 87:780-790.
- Amano M, et al. (2010) Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskelet*, 67:545-554.
- Amati-Bonneau P, et al. (2008) OPA1 mutations induce mitochondrial DNA stability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain*, 131:338-351.
- Anderson CA & Blackstone C (2013) SUMO wrestling with Drp1 at mitochondria. *EMBO J*, 32:1496-1498.
- Ankarcrona M, et al. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15:961-973.
- Antonsson B, et al. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, 277:370-372.
- Arazny Z, et al. (2007) The transcriptional coactivator PGC-1beta drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle. *Cell Metab*, 5:35-46.
- Arimura S & Tsutsumi N (2002) A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in *Arabidopsis* mitochondrial division. *PNAS*, 99:5727-5731.
- Arimura S, et al. (2004) Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *PNAS*, 101:7805-7808.
- Arundine M & Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34: 325-337.
- Astrup J, et al. (1977) Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. *Stroke*, 8:51-75.
- Axe EL, et al. (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 182:685-701.
- Baehrecke EH (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:505-510.
- Bach D, et al. (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. *J Biol Chem*, 278:17190-17197.
- Balaban RS (2009) The role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *BBA*, 1787:1334-1341.
- Baloh RH, et al. (2007) Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from Mitofusin 2 mutations. *J Neuroscience*, 27:422-430.
- Baltan S, et al. (2011) Histone deacetylase inhibitors preserve white matter structure and function during ischemia by conserving ATP and reducing excitotoxicity. *J Neuroscience*, 31:3990-3999.
- Banding H. & Greenberg M.E. (1991) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science*, 253:912-914.
- Bao Q & Shi Y (2007) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*, 14:56-65.
- Baron JC (2001) Mapping the ischaemic penumbra with PET: a new approach. *Brain*, 124:2-4.
- Barona T, et al. (2005) Diacylglycerol induces fusion of nuclear envelope membrane precursor vesicles. *J Biol Chem*, 280:41171-41177.

- 
- Barsoum MJ, et al. (2006) Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *Embo J* 25: 3900-3911.
- Basanez G, et al. (1999) Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *PNAS*, 96:5492-5497.
- Basova LV, et al. (2007) Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. *Biochem*, 46: 3423-3434.
- Bates G (2003) Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet*, 361:1642-1644.
- Baughman JM, et al. (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476:341-345.
- Benda C. (1898) *Arch. Anal. Physiol.* 393-398.
- Bergamini E, et al. (2007) The role of autophagy in aging: its essential part in the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Ann N Y Acad Sci*, 1114:69-78.
- Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiol Rev*, 79:1127-1155.
- Beyer K & Nuscher B (1996) Specific cardiolipin binding interferes with labelling of sulfhydryl residues in the adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier protein from beef heart mitochondria. *Biochemistry*, 35:15784-15790.
- Bink R, et al. (1954) Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone, and amino acid metabolism. *Am J Med*, 16:504-515.
- Birnboim HC & Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7:1513-1523.
- Black BL & Olson EN (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14:167-196.
- van der Bliek, AM (1999) functional diversity in the dynamin family, *Trends Cell Biol*, 9:96-102.
- Bliss TV & Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361:31-39.
- Boatright KM & Salvesen GS (2003) Mechanism of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 15:725-731.
- Bonfoco E, et al. (1995) Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *PNAS*, 92:7162-7166.
- Borsello T, et al. (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med*, 9:1180-1186.
- Bossard C, et al. (2007) Dimeric PKD regulates membrane fission to form transport carriers at the TGN. *J Cell Biol*, 179:1123-1131.
- Bourne JT, et al. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349:117-127.
- Brand MD & Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*, 435:297-312.
- Brennan AM, et al. (2009) NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nature Neuroscience*, 12:857-863.
- de Brito OM & Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456:605-610.
- Brown AW & Brierley JB (1972) Anoxic-ischaemic cell change in rat brain light microscopic and fine-structural observations. *J Neurol Sci*, 15:59-84.
- Brunello L, et al. (2005) Prsenilin-2 dampens intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by increasing Ca<sup>2+</sup> leakage and reducing Ca<sup>2+</sup> uptake. *J Cell Mol Med*, 13:3358-3369.

- 
- Brooks C, et al. (2007) Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *PNAS*, 104:11649-11654.
- Brunet AA, et al. (2005) Bcl-2, BH3-only and BNIP families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol*, 22:2395-2416.
- Brunden KR, et al. (2009) Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov*, 8:101-112.
- Bush WD & Simon JD (2007) Quantification of Ca<sup>2+</sup> binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis. *Pigment Cell Res*, 20:134-139.
- Bürmann F, et al. (2011) A bacterial dynamin-like protein mediating nucleotide-independent membrane fusion. *Mol Micro*, 79:1294-1304.
- Calì T, et al. (2012) Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and neurodegeneration. *Cell Calcium*, 52:73-85.
- Camacho A & Massieu L (2006) Role of Glutamate Transporters in the Clearance and Release of Glutamate during Ischemia and its Relation to Neuronal Death. *Archives of Medical Research* 37: 11-18.
- Caplan LR (1998) Stroke treatment: promising but still struggling. *JAMA*, 279:1304-1306.
- Cassidy-Stone A, et al. (2008) Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell*, 14(2):193-204.
- Carrie C, et al. (2013) How do plants make mitochondria? *Planta*, 237:429-439.
- Casasnovas C, et al. (2012) Phenotypic spectrum of Mfn2 mutations in the Spanish population. *J Med Genet*, 47:249-256.
- Casey L, et al. (2010) The function of the HIV1 protein Vpr and its action through the DCAF1.DDB1.Cullin4 ubiquitin ligase. *Cytokine*, 51:1-9.
- Cereghetti GM, et al. (2008) Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *PNAS*, 105:15803-15808.
- Chaban Y, et al. (2014) Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilization. *BBA*, 1837:418-426.
- Chan DC (2012) Fusion and fission: interlinked processes for mitochondrial health. *Annu Rev Genet*, 46:265-287.
- Chan NC, et al. (2011) Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Gen*, 20:1726-1737.
- Chang DT & Reynolds IJ (2006) Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture. *Neuroscience*, 141:727-736.
- Chen H, et al. (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160:189-200.
- Chen H, et al. (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, 130:548-562.
- Chen H, et al. (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell*, 141:280-289.
- Chen H & Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement and mitophagy- in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, 18:169-176.
- Chen KH, et al. (2004) Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat Cell Biol*, 6:872-883.
- Chen M, et al. (2009) Nitric Oxide as an Upstream Signal of p38 Mediates Hypoxia/Reoxygenation-Induced Neuronal Death. *Neurosignals*, 17:162-168.
- Chen SD, et al. (2011) Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 $\alpha$  and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int J Mol Sci*, 12:7199-7215.
- Chen Y & Dorn II GW (2013) PINK-phosphorylated mitofusin 2 is a parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*, 340:471-475.

- 
- Cho D-H, et al. (2009) S-Nitrosylation of Drp1 Mediates  $\beta$ -Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury. *Science*, 324: 102-105.
- Cho D-H, et al. (2010) Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci*, 67:3435-3447.
- Choi DW & Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual Rev Neuro*, 13:171-182.
- Choi SY, et al. (2006) A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol*, 8:1255-1262.
- Chou CH, et al. (2012) GSK3 $\beta$ -mediated Drp1 phosphorylation induced elongated mitochondrial morphology against oxidative stress. *PLOS ONE*, 7:e49112.
- Chu CT, et al. (2013) Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol*, 15:1197-1205.
- Cipolat S, et al. (2004) Opa1 requires mitofusina 1 to promote mitochondrial fusion. *PNAS*, 101:15927-15932.
- Cipolat S, et al. (2006) Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell*, 126:163-175.
- Cook DJ, et al. (2012) Treatment of stroke with PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. *Nature*, 483:213-217.
- Corti O, et al. (2011) What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev*, 91:1161-1218.
- Costa V, et al. (2010) Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli. *EMBO Mol Med*, 2:490-503.
- Cribbs JT & Strack S (2007) Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and Calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Reports*, 8:939-944.
- Csordás G, et al. (1999) Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondrial. *EMBO J*, 18:96-108.
- Csordás G, et al. (2006) Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol*, 174:915-921.
- Cunningham LA, et al. (2005) Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia*, 50:329-339.
- Czubryt MP, et al. (2003) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *PNAS*, 100:1711-1716.
- Daems WT & Wisse E (1966) Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J Ultrastruct Res*, 16:123-140.
- Danial NN & Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, 116:205-219.
- Daniele T, et al. (2014) Mitochondria and melanosomes establish physical contacts modulated by Mfn2 and involved in organelle. *Curr Biol*, 24:393-403.
- Deiry WS, et al. (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, 1:45-49.
- Demuro A, et al. (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem*, 280:17294-17300.
- Detmer SA & Chan DC (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:870-879.
- Desagher S & Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 10:369-377.
- Dickey AS & Strack S. (2011) PKA/AKAP1 and PP2A/B2 Regulate Neuronal Morphogenesis via Drp1 Phosphorylation and Mitochondrial Bioenergetics. *J Neuroscience*, 31:15716-15726.

- 
- Dimmer KS, et al. (2008) LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability. *Hum Mol Genet*, 17:201-214.
- Ding H, et al. (2008) Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem*, 106:2119-2130.
- Dirnagl U, et al. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22:391-397.
- Dorn II GW (2013) Mitochondrial dynamics and cardiac fate. *Circulation J*, 6:1370-1379.
- D'Orsi B, et al. (2012) Calpains are downstream effectors of bax-dependent excitotoxic apoptosis. *J Neuroscience*, 32:1847-1858.
- De Duve C & Baudhuin P (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev*, 46:323-357.
- De Duve C & Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, 28:435-492.
- Duvezin-Caubet S, et al. (2006) Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem*, 281:37972-37979.
- Emerman M & Malim MH (1998) HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*, 280:1880-1884.
- Erdmann R, et al. (2005) Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:738-742.
- Ernster, L & Schatz G (1981) Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol*, 91:227s-255s.
- Eura Y, et al. (2006) Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J Cell Sci*, 119:4913-4925.
- Exner N, et al. (2007) Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neuroscience*, 27:12413-12418.
- Fan MM & Raymond LA (2007) N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog. Neurobiology*, 81:272-293.
- Feagin JE (2000) Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol*, 30:371-390.
- Ferree AW, et al. (2013) MitoTimer probe reveals the impact of autophagy, fusion, and motility on subcellular distribution of young and old mitochondrial protein and on relative mitochondrial protein age. *Autophagy*, 9:1887-1896.
- Flavell SW, et al. (2008) Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron*, 60:1022-1038.
- Ford MG, et al. (2011) The crystal structure of dynamin. *Nature*, 477:561-566.
- Frank S, et al. (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*, 1:515-525.
- Frank S, et al. (2003) Scission, spores and apoptosis: a proposal for the evolutionary origin of mitochondria in cell death induction. *Biochem Biophys Res Com*, 204:481-486.
- Frezza C, et al. (2006) Opa1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, 126:177-189.
- Friedman JR, et al. (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*, 334:358-362.
- Friedman JR, et al. (2013) ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J Cell Biol*, 190:363-375.
- Fritz S, et al. (2001) Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol*, 152:683-692.
- Galluzzi L, et al. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ*, 19:107-120.

- 
- Gandre-Babbe S & van der Blik AM (2008) The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 19: 2402-2412.
- Gao Y, et al. (2005) Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-Jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis-signaling pathway. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25:694–712.
- Geisler S, et al. (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol*, 12:119-131.
- Gibson CL & Murphy SP (2010) Benefits of histone deacetylase inhibitors for acute brain injury; a systematic review of animal studies. *J Neurochem*, 115:806-813.
- Gillardon, F (2009) Leucine-rich repeat kinase 2 phosphorylates brain tubulin-beta isoforms and modulates microtubule stability – a point of convergence in parkinsonian neurodegeneration? *J Neurochem*, 110:1514-1522.
- Ginsberg MD (2009) Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke*; 40:111-114.
- Gispert S, et al. (2009) Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *Plos One*, 4:e5777.
- Glabe C (2001) Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer disease. *J Mol Neurosci*, 17:137-145.
- Goldberg M.P. and Choi D.W. (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neuroscience*, 13:3510-3524.
- Graham F.L., et al. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol*, 36:59-74.
- Griparic L, et al. (2007) Regulation of the mitochondrial dynamin like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol*, 178:757-764.
- Grimm S (2012) The ER-mitochondria interface: the social network of cell death. *BBA*, 2:327-334.
- Gunther C, et al. (2011) Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*, 477:335-339.
- Guo C, et al. (2013) SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. *EMBO J*, 32:1514-1528.
- Guo T, et al. (2007) A signal from inside the peroxisome initiates its division by promoting the remodeling of the peroxisomal membrane. *J Cell Biol*, 177:289-303.
- Haas TL, et al. (2009) Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell*, 36:831-844.
- Hailey DW, et al. (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141:656-667.
- Hales KG & Fuller MT (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, 90:121-9.
- Halliwell B & Gutteridge JM (1985) The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med*, 8:89-93.
- Hamasaki M, et al. (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495:389-393.
- Hamon MA, et al. (2012) Listeriolysin O: the swiss army knife of Listeria. *Trends Microbiol*, 20:360-368.
- Han XJ, et al. (2008) CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biology*, 182:573-585.
- Hansson Petersen CA, et al. (2008) The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *PNAS*, 105:13145-13150.
- Hardingham GE & Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in Neuro*, 26:81-89.

- 
- Hardingham GE & Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev*, 11:682-696.
- Hashimoto R, et al. (1999) Distribution of Rho-Kinase in the bovine brain. *BBRC*, 263:575-579.
- Hayashi T, et al. (2009) MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*, 19:81-88.
- Head B, et al. (2009) Inducible proteolytic inactivation of Opa1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol*, 187:959-966.
- Heid AB & Black BL (2005) Transgenic mice that express Cre recombinase under control of a skeletal muscle-specific promoter from *mef2c*. *Genesis*, 42:28-32.
- Helton TD, et al. (2008) Pruning and loss of excitatory synapses by the Parkin ubiquitin ligase. *PNAS*, 105:19492-19497.
- Hernandez G, et al. (2013) MitoTimer a novel tool for monitoring mitochondrial turnover. *Autophagy*, 9:1852-1861.
- Heymans HS, et al. (1983) Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome). *Nature*, 306:69-70.
- Hicks L & Fahimi HD (1977) Peroxisomes (microbodies) in the myocardium of rodents and primates. A comparative ultrastructural cytochemical study. *Cell Tissue Res*, 175:467-481.
- Hirobe T, et al. (2008) Mitochondria are more numerous and smaller in pink-eyed dilution melanoblasts and melanocytes than wild-type melanocytes in the neonatal mouse epidermis. *Zoolog Sci*, 25:1057-1065.
- Hirota Y, et al. (1968) Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 33:677-693.
- Hoepfner D, et al. (2005) Contribution of the endoplasmatic reticulum to peroxisome formation. *Cell*, 122:85-95.
- Hollenbeck PJ (1993) Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *J Cell Biol*, 121:305-315.
- Hollenbeck PJ (1996) The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci*, 1:d91-d102.
- Holler N, et al. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*, 1:489-495.
- Holmstrom KM & Finkel T (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 15:411-421.
- Hom J, et al. (2010) Regulation of mitochondrial fission by intracellular  $Ca^{2+}$  in rat ventricular myocytes. *BBA*, 1797:913-921.
- Hoppins S, et al. (2011) The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol Cell*, 41:150-160.
- Hossmann KA (1996) Excitotoxic mechanisms in focal ischemia. *Adv Neurol*, 71:69-74.
- Hsu YT, et al. (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-xL during apoptosis. *PNAS*, 94:3668-3672.
- Huang CY, et al. (2012) HIV-1 Vpr triggers mitochondrial destruction by impairing Mfn2-mediated ER-mitochondria interaction. *Plos One*, 7:e33657.
- Huang H & Frohman MA (2009) Lipid signaling on the mitochondrial surface. *BBA*, 1791:839-844.
- Huang P, et al. (2011) Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *Plos One*, 6:e20655.
- Huettenbrenner S, et al. (2003) The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mut Res*, 543:235-249.
- Huh GY, et al. (2001) Calpain proteolysis of alpha II-spectrin in the normal adult human brain. *Neurosci Lett*, 316:41-44.

---

Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 5:347-360.

Ichijo H, et al. (1997) Induction of Apoptosis by ASK1, a Mammalian MAPKKK That Activates SAPK/JNK and p38 Signaling Pathways. *Science*, 275:90-94.

Ikonomidou C & Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol*, 1:383-386.

Imoto M, et al. (1998) Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. *J Cell Sci*, 111:1341-1349.

INE (2006) Defunciones según la causa de muerte. <http://www.ine.es/>

Ishihara N, et al. (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci*, 118:3153-3161.

Ishihara N, et al. (2006) Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of Opa1. *EMBO J*, 25:2966-2977.

Ishihara N, et al. (2009) Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol*, 11:958-966.

Iwasawa R, et al. (2010) Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J*, 30:556-568.

Jahani-Asl A, et al. (2007) Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death. *J Biol Chem*, 282:23788-23798.

Jahani-Asl A, et al. (2011) The mitochondrial inner membrane GTPase, Optic Atrophy 1 (Opa1), restores mitochondrial morphology and promotes neuronal survival following excitotoxicity. *J Biol Chem*, 286:4772-4782.

James DI, et al. (2003) hFis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery. *J Biological Chemistry*, 278:36373-36379.

Jaramillo MC & Zhang DD (2012) The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Development*, 27:2179-2191.

John GB, et al. (2005) The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell*, 16:1543-1554.

Johnson CW, et al. (2012) Modulating macroautophagy: a neuronal perspective. *Future Med Chem*, 4:1715-1731.

Johnstone RW, et al. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108:153-164.

Joza, N, et al. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410:549-554.

Jung C, et al. (2004) Neurofilament transport is dependent on actin and myosin. *J Neuroscience*, 24:9486-9496.

Kagan VE, et al. (2005) cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol*, 1:223-232.

Kane LA, et al. (2014) PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J Cell Biol*, 205:143-153.

Kang JS, et al. (2008) Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell*, 132:137-148.

Karbowski M, et al. (2002) Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1 and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biology*, 159:931-938.

Karbowski M, et al. (2004) Quantification of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol*, 164:493-499.

Karbowski M, et al. (2006) Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature*, 443:658-662.

- 
- Kaste M (2005) Use of animals models has not contributed to development of acute stroke therapies. *Stroke*, 36:2323-2324.
- Katsura K, et al. (1993) Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis and phospholipase A2 and C activation during ischemia. *J Neurochem*, 61:1677-1684.
- Katsura K, et al. (1994) Energy metabolism, ion homeostasis and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans*, 22:991-996.
- Kay BK, et al. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signalling proteins with their cognate domains. *FASEB J*, 14:231-241.
- Kemper C, et al. (2008) Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J Cell Sci*, 121:1990-1998.
- Khorchid A & Ikura M (2002) How calpain is activated by calcium. *Nat Struct Biol*, 9:239-241.
- Kim C, et al. (2012) HDAC6 inhibitor blocks amyloid beta-induced impairment of mitochondrial transport in hippocampal neurons. *Plos One*, 7:e42983.
- Kim TH, et al. (2004) Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release. *Mol Biol Cell*, 15: 3061-3072.
- Klecker T, et al. (2014) Making connections: interorganelle contacts orchestrate mitochondrial behavior. *Trends in Cell Biol*, pii:S0962-8924.
- Knott AB, et al. (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 9:505-518.
- Koch A, et al. (2003) Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem*, 278:8597-8605.
- Koch A, et al. (2005) A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 16:5077-5086.
- Koch JC, et al. (2014) ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. *Cell Death & Disease*, 5.
- Komatsu M, et al. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441:880-884.
- Koonin EV & Aravind L (2002) Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death & Differ*, 9:394-404.
- Korobova F, et al. (2013) An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science*, 339:464-467.
- Kirichok Y, et al. (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427:360-364.
- Kuma A, et al. (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432:1032-1036.
- Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 14:32-43.
- Koshiba T, et al. (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305:858-862.
- Kumari S, et al. (2012) Hyperglycemia alters mitochondrial fission and fusion proteins in mice subjected to cerebral ischemia and reperfusion. *Trans Stroke Res*, 3:296-304.
- Kuroiwa T, et al. (2006) Structure, function and evolution of the mitochondrial division apparatus. *BBA*, 1763:510-521.
- Kuwana T, et al. (2002) Newmeyer, Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 11:331-342.
- Lackner LL & Nunnari JM (2009) The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *BBA*, 1792:1138-1144.
- Lamp CA, et al. (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14:759-774.

- 
- Lanave C, et al. (2004) Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. *Gene*, 333:71-79.
- Laster SM, et al. (1988) Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol*, 141:2629-2634.
- Lau A & Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Eur J Physiol*, 460:525-542.
- Lavrik I, et al. (2005) Death receptor signaling. *J Cell Sci*, 118:265-267.
- Leboucher GP, et al. (2012) Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Mol Cell*, 47:547-557.
- Lee CS, et al. (2006) The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol*, 8:477-484.
- Lee JS, et al. (2011) Histone deacetylase inhibitors induce mitochondrial elongation. *J Cellular Physiol*, 227:2856-2869.
- Lee S, et al. (2011) Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *J Neurosci*, 31:7817-7830.
- Lee S, et al. (2012) Mitofusin 2 is necessary for striatal axonal projections of midbrain dopamine neurons. *Hum Mol Genet*, 21:4827-4835.
- Lee YJ, et al. (2011) Elevated global SUMOylation in Ubc9 transgenic mice protects their brains against focal cerebral ischemic damage. *Plos One*, 6:e25852.
- Legros F, et al. (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell*, 13:4343-4354.
- Legros F, et al. (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci*, 117:2653-2662.
- Lehner PJ, et al. (2005) Downregulation of cell surface receptors by the K3 family of viral and cellular ubiquitin E3 ligases. *Immunol Rev*, 207:112-125.
- Lei X, et al. (2008) Calcium-independent phospholipase A2-mediated ceramide generation plays a key role in the cross-talk between the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria during ER stress-induced insulin-secreting cell apoptosis. *J Biol Chem*, 283:34819-34832.
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88:323-331.
- Levine B & Kroemer G (2003) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132:27-42.
- Lewis MR & Lewis WH (1914) Mitochondria in tissue culture. *Science*, 39:330-33.
- Li J, et al. (2010) Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity. *Cell Metab*, 12:154-165.
- Li J, et al. (2012) Lysocardiolipin acyltransferase 1 (ALCAT1) controls mitochondrial DNA fidelity and biogenesis through modulation of MFN2 expression. *PNAS*, 109:6975-6980.
- Li M, et al. (2001) Myocyte enhancer factor 2A and 2D undergo phosphorylation and caspase-mediated degradation during apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *J Neuroscience*, 21:6544-6552.
- Li Y, et al. (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  regulates mitofusin 2 expression in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 46:876-882.
- Li Z, et al. (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, 119:873-887.
- Liang XH, et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402:672-676.
- Liesa M, et al. (2008) Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1 $\beta$ . *Plos One*, 3:e3613.
- Liesa M, et al. (2009) Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Review*, 89:799-845.
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79:1431-1468.

- 
- Liu X, et al. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86:147-157.
- Liu X, et al. (2009) Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J*, 28:3074-3089.
- Lo EH (2008) A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med*, 14:497-500.
- Lo SC & Hannink M (2006) PGAM5, a Bcl-xL-interacting protein, is a novel substrate for the redox-regulated Keap1-dependent ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*, 281:37893-37903.
- Lo SC & Hannink M (2009) PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp Cell Res*, 314:1789-1803.
- Loew LM, et al. (1994) Physiological cytosolic Ca<sup>2+</sup> transient evoke concurrent mitochondrial depolarization. *PNAS*, 91:12579-12583.
- Lokireddy S, et al. (2012) The ubiquitin ligase Muf1 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli. *Cell Metab*, 16:613-624.
- López-Doménech G, et al. (2011) The eutherian *Armcx* genes regulate mitochondrial trafficking in neurons and interact with Miro and Trak2. *Nat Commun*, 3:814-825.
- Losón OC, et al. (2013) Fis1, Mff, MiD49 and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, 24: 659-667.
- Love S (2003) Apoptosis and brain ischaemia. *Progr Neuro-Psychopharm Biol Psych*, 27:267-282.
- Low HH & Löwe J (2006) A bacterial dynamin-like protein. *Nature*, 444:766-769.
- Low HH, et al. (2009) Structure of a bacterial dynamin-like protein lipid tube provides a mechanism for assembly and membrane curving. *Cell*, 139:1342-1352.
- Lloyd-Jones D, et al. (2009) Heart disease and stroke statistics-2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 119:480-486.
- Luetjens CM, et al. (2000) Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J Neuroscience*, 20:5715-5723.
- Lustbader JW, et al. (2004) ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science*, 304:448-452.
- MacAskill AF, et al. (2009) GTPase dependent recruitment of Grif-1 by Miro1 regulates mitochondrial trafficking in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*, 40:301-312.
- Macchi M, et al. (2012) The *Drosophila* inner-membrane protein PMI controls crista biogenesis and mitochondrial diameter. *J Cell Sci*, 126:814-824.
- MacLeod DA, et al. (2013) RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk. *Neuron*, 77:425-439.
- McKinsey TA, et al. (2002) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*, 408:106-111.
- Malorni W, et al. (2007) Dynamics of lipid raft components during lymphocyte apoptosis: the paradigmatic role of GD3. *Apoptosis*, 12:941-949.
- Malorni W, et al. (2008) Analyzing lipid raft dynamics during cell apoptosis. *Meth Enzymol*, 442:125-140.
- Mammucari C, et al. (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle *in vivo*. *Cell Metab*, 6:458-471.
- Manczak M, et al. (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet*, 20:2495-2509.
- Manders E.M.M., et al. (1993) Measurement of co-localization of 425 objects in dual-colour confocal images. *J Microscopy*, 169:375-382.

- 
- Mannella CA, et al. (1994) The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscopy. *Microsc Res Tech*, 27:278-283.
- Mao Z, et al. (1999) Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science*, 286:785-790.
- Martin SJ (2011) Mitochondrial fusion: Bax to the fussure. *Develop Cell*, 20:142-143.
- McLelland G-L, et al. (2014) Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J*, 33:282-295.
- Meer G, et al. (2009) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:112-124.
- Mehta SL, et al. (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*, 54:34-66.
- Meeusen S, et al. (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed *in vitro*. *Science*, 305:1747-1752.
- van Meer G, et al. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:112-124.
- Miguel-Hidalgo JJ, et al. (2002) Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by  $\beta$ -amyloid. *Brain Res*, 958:210-221.
- Miller JA, et al. (2014) Transcriptional landscape of the prenatal human brain. *Nature*, 508:199-207.
- Milnerwood AJ, et al. (2012) Mitigation of augmented extrasynaptic NMDAR signaling and apoptosis in corticostriatal co-cultures from Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis*, 48:40-51.
- Minucci S & Pelicci PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, 6:38-51.
- Misko A, et al. (2010) Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neuroscience*, 30:4232-4240.
- Misko A, et al. (2012) Mitofusin 2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. *J Neuroscience*, 32:4145-4155.
- Mizushima M & Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147:728-741.
- Montessuit S, et al. (2010) Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates bax oligomerization. *Cell*, 142:889-901.
- Morgan MJ & Liu Z (2013) Programmed cell death with a necrotic-like phenotype. *Biomol Concepts*, 4:259-275.
- Moskowitz MA, et al. (2010) The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron Review*, 67:181-198.
- Mozdy AD & Shaw JM (2003) A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:468-478.
- Muftuoglu M, et al. (2004) Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Mov Disord*, 19:544-548.
- Muir KW & Grosset DG (1999) Neuroprotection for acute stroke: making clinical trials work. *Stroke*, 30:180-182.
- Muir KW (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol*, 6:53-60.
- Muñoz JP, et al. (2013) Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *EMBO J*, 32:2348-2361.
- Myung JK, et al. (2003) Deranged hypothetical proteins Rik protein, Nit protein 2 and mitochondrial inner membrane protein, mitofilin, in fetal Down syndrome brain. *Cell Mol Biol*, 49: 739-746.
- Nakamura N, et al. (2006) MARCH-V is a novel mitofusin 2 and Drp1 binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep*, 7:1019-1022.

- 
- Narendra DP, et al. (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *Plos Biol*, 8:e1000298.
- Nass S & Nass MM (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J Cell Biol*, 19:613-629.
- Naya FJ, et al. (2002) Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nat Med*, 8:1303-1309.
- Nechushtan A, et al. (2001) Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol*, 153:1265-1276.
- Neupert W & Brunner M (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3:555-565.
- Neuspiel M, et al. (2005) Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem*, 280:25060-25070.
- Neuspiel M, et al. (2008) Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Current Biol*, 18:102-108.
- Nicholls DG (2009) Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *BBA*, 1787:1416-1424.
- NINDS (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA stroke study group. *N Engl J Med*, 333:1581-1587.
- Nixon RA & Yang DS (2011) Autophagy failure in Alzheimer's disease-locating the primary defect. *Neurobiol Dis*, 43:38-45.
- Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, 19:983-997.
- Nowikovsky K, et al. (2012) The pathophysiology of LETM1. *J Gen Physiol*, 139:445-454.
- Okamoto S-I, et al. (2002) Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *PNAS*, 99:3974-3979.
- Olichon A, et al. (2002) The human dynamin-related protein Opa1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett*, 523:171-176.
- Olney JW (1969) Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164:719-721.
- OMS (2007) The Atlas of disease cardiovascular and stroke. <http://who.int/home-page/index.es.shtml>
- Onoue K, et al. (2012) Fis1 acts as a mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that is involved in regulation of mitochondrial morphology. *J Cell Sci*, 126:176-185.
- Otera H, et al. (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*, 191:1141-1158.
- Otera H & Mihara K (2011) Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small GTPases*, 2:167-172.
- Otera H, et al. (2013) New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *BBA*, 1833:1256-1268.
- Ow YL, et al. (2008) Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9:532-542.
- Pagliarini DJ, et al. (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134:133-140.
- Palmer CS, et al. (2011) MiD49 and MiD 51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Reports*, 12:565-573.
- Pan S, et al. (2011) Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca<sup>2+</sup> influx mechanisms. *Life Science*, 54:763-769.

- 
- Parameshwaran K, et al. (2008) Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Neurobiology*, 210:7-13.
- Parekh AB (2003) Mitochondrial regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling: more than just simple Ca<sup>2+</sup> buffers. *News Physiol Sci*, 18:252-256.
- Parihar MS, et al. (2009) Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Inter J Biochem Cell Biol*, 41:2015-2024.
- Petralia RS, et al. (2010) Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *J Neuroscience*, 167:68-87.
- Pham AH, et al. (2012) Loss of Mfn2 results in progressive, retrograde degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal circuit. *Hum Mol Genet*, 21:4817-4826.
- Piao L, et al. (2009) regulation of Opa1-mediated mitochondrial fusion by leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein-1 plays a role in apoptosis. *Cell Signal*, 21:767-777.
- Pich S, et al. (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Gene*, 14:1405-1415.
- Piller SC, et al. (1996) Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *PNAS*, 93:111-115.
- Praefcke GJ & McMahon HT (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tabulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5:133-147.
- Puyal J, et al. (2009) Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol*, 66:378-389.
- Puyal J, et al. (2013) Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog Neurobiol*, 105:24-48.
- Qi X, et al. (2011). Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C{delta} under oxidative stress conditions in vivo. *Mol Biol Cell*, 22:256-265.
- Qiu J, et al. (2013) Mitochondrial calcium uniporter Mcu controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals. *Nature communication*, 4:2034.
- Quintero OA (2009) Human Myo19 is a novel myosin that associates with mitochondria. *Curr Biol*, 19:2008-2013.
- Ramonet D, et al. (2013) Optic atrophy 1 mediates mitochondria remodeling and dopaminergic neurodegeneration linked to complex I deficiency. *Cell Death & Differ*, 20:77-85.
- Ramos-Cejudo J, et al. (2012) Spatial and temporal gene expression differences in core and periinfarct areas in experimental stroke: a microarray analysis. *Plos One*, 7:e52121.
- Rehncrona S (1985) Brain acidosis. *Ann Emer Med*, 14:770-776.
- Reposo G, et al. (2001) Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol*, 152:809-824.
- Reunanen H, et al. (1985) Studies on vinblastine-induced autophagocytosis in mouse liver V. A cytochemical study on the origin of membranes. *Histochemistry*, 83:513-517.
- Reynier P, et al. (2004) Opa3 gene mutations responsible for autosomal dominant optic atrophy and cataract. *J Med Genet*, 41:e110.
- Ribert D, et al. (2010) *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature*, 464:1192-1195.
- Ricci JE, et al. (2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*, 117:773-786.
- Rintoul GL, et al. (2003) Glutamate decreases mitochondrial size and movement in primary forebrain neurons. *J Neuroscience*, 23(21):7881-7888.
- Rival T, et al. (2011) Inner-membrane proteins OMI/TMEM11 regulate mitochondrial morphogenesis independently of the Drp1/Mfn fission/fusion pathways. *EMBO reports*, 12:223-230.

- 
- Rizzuto R, et al. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  response. *Science*, 280:1763-1766.
- Robert-Lewis JM, et al. (1994) Immunolocalization of Calpain I-mediated Spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain. *J Neuroscience*, 14:3934-3944.
- Rojo M, et al. (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*, 115:1663-1674.
- Rolland SG & Conradt B (2010) New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Curr Opin in Cell Biol*, 22:852-858.
- Rommanello V, et al. (2010) Mitochondrial fission and remodeling contributes to muscle atrophy. *EMBO J*, 29:1774-1785.
- Rossi DJ, et al. (2000) Gutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403:316-321.
- Rowland AA & Voeltz GK (2012) Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 13:607-615.
- Ruan Y, et al. (2013) Loss of Yme1L perturbs mitochondrial dynamics. *Cell Death & Disease*, 4:e896.
- Rubinsztein DC, et al. (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse disease. *Nat Rev Drug Discov*, 11:709-730.
- Ruby JR, et al. (1969) Continuities between mitochondria and endoplasmic reticulum in the mammalian ovary, *Z. Zellforsch. Mikrosk Anat*, 97:30-37.
- Ryu SW, et al. (2010) Optic atrophy 3 as a protein of the mitochondrial outer membrane induces mitochondrial fragmentation. *Cell Mol Life Sci*, 67:2839-2850.
- Saftig P & Klumperman J (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10:623-635.
- Santel A & Fuller MT (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*, 114:867-874.
- Santel A, et al. (2003) Mitofusin-1 protein is generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci*, 116:2763-2774.
- Satoh M, et al. (2003) Differential sublocalization of the dynamin-related protein Opa1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 300:482-493.
- Sattler R, et al. (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 284:1845-1848.
- Sebastián D, et al. (2011) Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *PNAS*, 109:5523-5528.
- Scheschonka A, et al. (2007) Sumoylation in neurons: nuclear and synaptic roles? *Trends in Neuro*, 30:85-91.
- Schlame M (2008) Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J Lipid Res*, 49:1607-1620.
- Schon EA & Przedborski S (2011) Mitochondria: The next (neuro)generation. *Neuron Review*, 70:1033-1053.
- Schug ZT & Gottlieb E (2009) Cardiolipin acts as a mitochondrial signaling platform to launch apoptosis. *BBA*, 1788:2022-2031.
- Scout I, et al. (2006) BIGYIN, an orthologue of human and yeast FIS1 genes functions in the control of mitochondrial size and number in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 57:1275-1280.
- Segales J, et al. (2013) A form of Mitofusin 2 (Mfn2) lacking the transmembrane domains and the C-terminal end stimulates metabolism in muscle and liver cells. *American J of Physiol Endo Metab*.
- Serrat R, et al. (2013) Thenon-canonical Wnt/PKC pathway regulates mitochondrial dynamics through degradation of the arm-like domain-containing protein Alex3. *Plos One*, 8:e67773.

- 
- Sesaki H & Jensen RE (1999) Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol*, 147:699-706.
- Sesaki H & Jensen RE (2001) UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol*, 152:1123-1134.
- Sesaki H & Jensen RE (2004) Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem*, 279:28298-28303.
- Shelat PB, et al. (2013) The membrane-active tri-block copolymer pluronic F-68 profoundly rescues rat hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced death through early inhibition of apoptosis. *J Neuroscience*, 33:12287-12299.
- Schmued L, et al. (2005) Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res*, 1035:24-31.
- Shen T, et al. (2007) Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis. *J Biol Chem*, 282:23354-23361.
- Sheng Z-H & Cai Q (2012) Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neuro*, 13:77-93.
- Sheng Z-H (2014) Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: new insight and implications. *J Cell Biol*, 204:1087-2098.
- Shoshan-Barmatz V, et al. (2010) VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Asp of Med*, 31:227-285.
- Singh SB et al. (2010) Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nat Cell Biol*, 12:1154-1165.
- Sloan DB, et al. (2012) Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates. *Plos Biol*, 10:e1001241.
- Smirnova E, et al. (1998) A Human Dynamin-related Protein Controls the Distribution of Mitochondria. *J Cell Biology* 143: 351-358.
- Smith PD, et al. (2006) Calpain-regulated p35/cdk5 plays a central role in dopaminergic neuron death through modulation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neuroscience*, 26:440-447.
- Song Z, et al. (2007) Opa1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential and Yme1L. *J Cell Biol*, 178:749-755.
- Sorianello E, et al. (2012) The promoter activity of human Mfn2 depends on Sp1 in vascular smooth muscle cells. *Cardio Res*, 94:38-47.
- Soriano FX, et al. (2006a) Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , estrogen-related receptor- $\alpha$ , and mitofusin 2. *Diabetes*, 55:1783-1791.
- Soriano FX, et al. (2006b) Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *J Neurosciences*, 26:10696-10710.
- Soriano FX & Hardingham GE (2007) Compartmentalized NMDA receptor signaling to survival and death. *J Physiol*, 584:381-387.
- Soriano FX, et al. (2008) Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NR2B PDZ ligand. *J Neuroscience*, 28:10696-10710.
- Stavru F, et al. (2013) Atypical mitochondrial fission upon bacterial infection. *PNAS*, 110:16003-16008.
- Stefanis L, et al. (2001) Expression of A53T mutant but not wild-type  $\alpha$ -synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release and autophagic cell death. *J Neuroscience*, 21:9549-9560.
- Stowers RS, et al. (2002) Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel *Drosophila* protein. *Neuron*, 36:1063-1077.

- 
- Stroebel D & Paoletti P (2014) Neuroscience: a structure to remember. *Nature*, 511:162-163.
- Stuckey JA & Dixon JE (1999) Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nature Struct. Biol*, 6:278-284.
- Suen DF, et al. (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev*, 22:1577-1590.
- Sugioka R, et al. (2004) Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, 279:52726-52734.
- Sugiura A, et al. (2014) A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO Rev*, pii:e201488104.
- Szabadkai G, et al. (2004) Drp1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca<sup>2+</sup> waves and protects against Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptosis. *Mol Cell*, 16:59-68.
- Szydłowska K & Tymianski M (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, 47:122-129.
- Taguchi N, et al. (2007) Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem*, 282:11521-11529.
- Tanaka A, et al. (2010) Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *JCB*, 191:1367-1380.
- Tang X, et al. (2005) Cyclin-dependent kinase 5 mediates neurotoxin-induced degradation of the transcription factor myocyte enhancer factor 2. *J Neuroscience*, 25:4823-4834.
- Thastrup O, et al. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *PNAS*, 87:2466-2470.
- Tondera D, et al. (2004) Knockdown of MTP18, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent protein, affects mitochondrial morphology and induces apoptosis. *J Biol Chem*, 279:31544-31555.
- Tondera D, et al. (2005) The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Science*, 118:3049-3059.
- Toulmay A & Prinz WA (2012) A conserved membrane-binding domain targets proteins to organelle contact sites. *J Cell Sci*, 125:49-58.
- Traynelis SF & Cull-Candy SG (1990) Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature*, 345:347-350.
- Trushina E, et al. (2004) Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*, 24:8195-8209.
- Tsai TD & Barish ME (1995) imaging of caffeine-inducible release of intracellular calcium in cultured embryonic mouse telencephalic neurons. *J Neurobiol*, 27:252-265.
- Twig G, et al. (2008) Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis. *BBA*, 1777:1092-1097.
- Uren AG, et al. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell*, 6:961-967.
- Usachev Y, et al. (1993) Caffeine-induced calcium release from internal stores in cultured rat sensory neurons. *Neuroscience*, 57:845-859.
- Vafai SB & Mootha VK (2012) Mitochondrial disorders as Windows into an ancient organelle. *Nature Review*, 491:374-383.
- Valente EM, et al. (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304:1158-1160.
- Vance JE (1990) Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*, 265:7248-7256.
- Vandenabeele P, et al. (2010) Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11:700-714.

- 
- Vaslin A, et al. (2009) Excitotoxicity-induced endocytosis confers drug targeting in cerebral ischemia. *Annals of Neurology* 65: 337-347.
- Vercammen D, et al. (1998) Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 187:1477-1485.
- Vitale N, et al. (2004) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J*, 20:2424-2434.
- de Vos KJ, et al. (2005) Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol*, 15:678-683.
- Waetzig V, et al. (2006) The bright side of JNKs—multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog Neurobiol*, 80:84–97.
- Wahl A-S, et al. (2009) Hypoxic/ischemic conditions induce expression of the putative pro-death gene Clca1 via activation of extrasynaptic N-Methyl-D-Aspartate receptors. *Neuroscience*, 158:344-352.
- Wan B & Moreadith RW (1995) Structural characterization and regulatory element analysis of the heart isoform of cytochrome c oxidase VIa. *J Biol Chem*, 270:26433-26440.
- Wang D, et al. (2012) A small molecule promotes mitochondrial fusion in mammalian cells. *Angew Chem Int Ed*, 51:9302-9305.
- Wang H, et al. (2009) Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Hum Mol Genet*, 18:737-752.
- Wang KK, et al. (1989) Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. *Biochem J*, 262:693-706.
- Wang W, et al. (2010) Mitofusin 2 is a novel direct target of p53. *Biochem Biophys Res Commun*, 400:587-592.
- Wang W, et al. (2012) Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metab*, 15:186-200.
- Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 15:2922-2933.
- Wang X, et al. (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neuroscience*, 29:9090-9103.
- Wang X, et al. (2011) PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*, 147:893-906.
- Wang X, et al. (2012) LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1. *Human Molecular Genetics*, 21:1931–1944.
- Wang Z, et al. (2012) The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*, 148:228-243.
- Wappler EA, et al. (2013) Mitochondrial dynamics associated with oxygen-glucose deprivation in rat primary neuronal cultures. *Plos One*, 8:e63206.
- Warach S (2003) Measurement of the ischemic penumbra with MRI: it's about time. *Stroke*, 34:2533-2534.
- Wasiak S, et al. (2007) Bax/Bak promote sumoylation of Drp1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol*, 177: 439-450.
- Wei MC, et al. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292:727-730.
- Wei G, et al. (2012) Calpain-mediated degradation of myocyte enhancer factor 2D contributes to excitotoxicity by activation of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*, 287:5797-5805.
- Westermann B (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev*, 11:872-884.
- Westermann B (2011) Organelle dynamics: ER embraces mitochondria for fission. *Current Biol*, 21:922-924.

- 
- Wolter KG, et al (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, 139:1281-1292.
- Wong ED, et al. (2000) The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol*, 151:341-352.
- Xiang H, et al. (1998) Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J of Neuroscience*, 18:1363-1373.
- Xing H, et al. (2004) Caffeine Releasable Stores of Ca<sup>2+</sup> Show Depletion Prior to the Final Steps in Delayed CA1 Neuronal Death. *J Neurophysiol*, 92:2960-2967.
- Xu W, et al. (2004) Nitric oxide induces coupling of mitochondrial signalling with the endoplasmic reticulum stress response. *Nature Cell Biol*, 6:1129-1134.
- Xu Y, et al. (2013) KEAP1 is a redox sensitive target that arbitrates the opposing radiosensitive effects of parthenolide in normal and cancer cells. *Cancer Research*, 73:4406-4417.
- Wyss-Coray T (2006) Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med*, 12:1005-1015.
- Yamano K, et al. (2014) Mitochondrial Rab GAPs govern autophagosome biogenesis during mitophagy. *eLIFE*, 3:e01612.
- Yoon Y, et al. (1998) A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *J Cell Biol*, 140:779-793.
- Yoon Y, et al. (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol*, 23: 5409-5420.
- Youle RJ & Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12:9-14.
- Young KW, et al. (2010) Different pathways lead to mitochondrial fragmentation during apoptotic and excitotoxic cell death in primary neurons. *J Biochem Mol Toxicol*, 24(5):335-341.
- Yuan H, et al. (2006) Mitochondrial fission is an upstream and required event for Bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. *Cell Death Differ*, 14:462-471.
- Zamzami N, et al. (1995) Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med*, 182:367-377.
- Zhang SJ, et al. (2007) Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron*, 53:549-562.
- Zhao J, et al. (2011) Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J*, 30:2762-2778.
- Zhao J, et al. (2013) Regulation of mitochondrial dynamics: convergences and divergences between yeast and vertebrates. *Cell Mol Life Sci*, 70:951-976.
- Zhao T, et al. (2012) Central Role of Mitofusin 2 in Autophagosome-Lysosome Fusion in Cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 287:23615-23625.
- Zhou W, et al. (2010) Mutation of the protein kinase A phosphorylation site influences the anti-proliferative activity of mitofusin 2. *Atherosclerosis*, 211:216-223.
- Zhu M, et al. (2013) Histone deacetylase inhibitors prevent mitochondrial fragmentation and elicit early neuroprotection against MPP<sup>+</sup>. *CNS Neurosci & Therapeu*, 1-9.
- Zick M, et al. (2009) Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *BBA*, 1793:5-19.
- Züchner S & Vance JM (2006) Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromol Med*, 8:63-74.

---

## ANEXO 1

Tabla resumen de proteínas pro-fusión y pro fisión

---

## PROTEÍNAS PRO-FUSIÓN & SUPERVIVENCIA

Nombre	Contexto	Localización	Función
Mfn1 y 2	Fusión	OMM	Promueve la fusión de OMM, frena la entrada a ciclo, colabora en transporte mito, conecta mito con RE, Mfn1 + eficiente en fusión que Mfn2
Opa1	Fusión	IMM	Promueve la fusión de IMM mediante la interacción con Mfn1 e interactúa con mtDNA
M1	Fusión	Compuesto químico	Promueve la fusión, aumenta supervivencia y niveles ATP sintetasa
Paraplegin	Fusión	IMM	Activa Opa1 por proteólisis
MitoPLD	Fusión	OMM	Interactúa con Mfn, mantiene la integridad de las mitocondrias e hidroliza la cardiolipina creando ácido fosfatídico
Prohibitin	Fusión	IMM	Protege de la ubiquitinación a las proteínas de la IMM
TMEM11	Fusión	IMM	Mantiene estructura y diámetro de las crestas mitocondriales
MIEF1	Fusión	OMM	Recluta e inhibe a Drp1 y promueve la fusión
Bax & Bak	Apoptosis	Cytosolic/OMM	Interactúan con Mfn y promueven la fusión.
Mcl1	Apoptosis	Mitocondrial	Inhibe la apoptosis evitando entrada Calcio a la mito
Stoml2	Potencial	IMM	Mantiene el $\Delta\Psi_m$
SENP5	Protease	Cytosolic	Proteoliza dianas de SUMO1 e inhibe Drp1
SUMO2 & 3	SUMOylation	Cytosolic	SUMOylation de Drp1 y se inhibe
Tau	Alzheimer	Cytosolic	Inhibe reclutamiento Drp1 al estabilizar la actina
SLP2	Estrés general	Cytosolic	Induce hiperfusión ante situación de estrés
MEF2	Señalización	Cytosolic	Activa la síntesis de Mfn2, regula gen beta-secretasa,
PKA	Señalización	Cytosolic	Inhibe Drp1 y BAD por fosforilación
AKAP1	Señalización	OMM	Receptor PKA en la mitocondria
p38 MPAK	Señalización	Cytosolic	Activa a MEF2 por fosforilación
Pim-1	Señalización	Cytosolic	Fosforila e inhibe Drp1
Calcineurin	Señalización	Cytosolic	Activa MEF2
PGC-1 $\beta$	Señalización	Membrana plasmática	Aumenta actividad promotor Mfn2 y la fusión
GSK3beta	Señalización	Cytosolic	Fosforila e inhibe Drp1

---

SP1	Señalización		Activa expresión Mfn2
p53	Señalización	Cytosolic	Activa expresión Mfn2
IBRDC2	E3 ligasas	Cytosolic	Inhibe Bax por ubiquitinación
Usp9x	Deubiquitinasas	Cytosolic/OMM	Activa Mcl1 por deubiquitinación
Usp30	Deubiquitinasas	Cytosolic/OMM	Mantiene la dinámica mitocondrial deubiquitinando alguna proteína

## PROTEÍNAS PRO-FISIÓN & APOPTOSIS

Nombre	Contexto	Localización	Función
Drp1	Fisión	Cytosolic	Encargada de constreñir la mitocondria y los peroxisomas
Fis 1	Fisión	OMM	Receptor para Drp1?? promueve fisión de peroxisomas y mitocondrias; interactúa con Bap31
Endophilin B1	Fisión	Cytosolic	Regula curvatura de membrana, deforma la bicapa lipídica y podría reclutar Drp1 con Bax y Bak
Opa3	Fisión	OMM	Promueve la fisión, interactúa con Mfn1
MIB	Fisión	Cytosolic/Mitochondrial	Inhibe a Mfn y regula la morfología mitocondrial
MTP18	Fisión	IMM	Podría fisionar la IMM, regular la distribución de Drp1 e interactuar con Fis1
GDAP1	Fisión	OMM	Promueve fisión vía Drp1
MFF	Fisión	OMM	Promueve la fisión reclutando a Drp1
MID49&51	Fisión	OMM	Quizás recluta a Drp1
Dap3	Fisión	Mitochondrial	Promueve la fisión
PP2A/Bβ2	Fisión	Cytosolic	De-fosforila y activa Drp1
PGAM5	Fisión	OMM	De-fosforila y activa Drp1 y ASK1
PARL	Fisión	Mitochondrial	Proteoliza a Opa1
AAA proteasa	Fisión	IMM	Proteoliza a Opa1
OMA1	Fisión	IMM	Proteoliza a Opa1
CDK1/cyclina B	Ciclo celular	Cytosolic	Activa a Drp1 por fosforilación durante la mitosis
Cdk5	Ciclo celular	Cytosolic	Inhibe a MEF2A y D por fosforilación
Bax & Bak	Apoptosis	Cytosolic/OMM	Interactúan con Drp1 y Endophilin B1 promoviendo la apoptosis
Caspase	Apoptosis	Mitochondrial/cytosolic	Corta a MEF2 y provoca la apoptosis
Bik	Apoptosis	ER	Promueve reclutamiento Drp1 a mitocondria
BNIP1	Apoptosis	ER	Promueve la fisión mediante Drp1 y acelera activación Bap31
NMDAr	Señalización	Membrana plasmática	Su sobre-activación promueve aumento de calcio y activación Cdk5
Glutamate	Señalización	Extracelular	Promueve la excitotoxicidad activando el receptor NMDA
Bap31	Señalización	ER	Interactúa con Fis1 y BNIP1 y promueve liberación Ca <sup>2+</sup> de ER a mitocondrias
ALCAT1	Señalización	OMM	Elimina la CL y controla la expresión génica de Mfn1/2 promoviendo fisión
Calmodulin	Señalización	Cytosolic	Activa Drp1 por fosforilación
Calcineurin	Señalización	Cytosolic	Activa Drp1 por de-fosforilación de los residuos de PKA.
CaMKIα	Señalización	Cytosolic	Activa Drp1 por fosforilación
ROCK1	Señalización	Cytosolic	Activa Drp1 por fosforilación
PKC	Señalización	Cytosolic	Activa Drp1 por fosforilación
HDAC	Señalización	Cytosolic/Nucleus	
LRRK2	Señalización	Cytosolic	Activa Drp1 por fosforilación

NO	Señalización	Celular	Activa Drp1 por nitrosilación.
JNK	Señalización	Celular	Fosforila a Mfn2 para ser reconocida por Huwe1 y degradada
Mule	E3 ligasas	Cytosolic	Inhibe Mcl1 por ubiquitinación
Mul1	E3 ligasas	OMM	Ubiquitina a Mfn2 para su degradación y estabiliza Drp1
MULAN	E3 ligasas	OMM	Promueve la fisión y activa Drp1 por ubiquitinación
MAPL	E3 ligasas	Mitocondrial	Activa Drp1 por ubiquitinación y también actúa como SUMO
MARCH5	E3 ligasas	OMM	Activa Drp1 y Fis1 e inhibe Mfn2 por ubiquitinación; además regula las proteínas SOD
Huwe1	E3 ligasas		Ubiquitina a Mfn2 para su degradación
Siah2	E3 ligasas	Cytosolic	Se activa por hipoxia y ubiquitina a AKAP1 promoviendo la fisión
PINK1 & Parkin	Parkinson/E3	Cytosolic	PINK1 se activa en hipoxia, fosforila a Mfn2 y la marca para que Parkin se una y ubiquitine a Mfn2. También marca a Miro
Cdc48/p97	Parkinson	Cytosolic	Media degradación Mfn1/2 y regula el rol de las proteínas del OMM
CMA	Parkinson	Cytosolic	Chaperona que degrada MEF2
A $\beta$	Alzheimer	Extracelular/Cytosolic	Inhibe a MEF2 y regula Drp1
ABAD	Alzheimer	Mitocondrial	Interactúa con A $\beta$ y aumenta ROS
Htt	Huntington	Cytosolic	Disfunción del $\Delta\Psi_m$ , aumento del calcio, activa a Drp1, disminuye el ATP, inhibe la fusión y fastidia los astrocitos
LETM1	Wolff-Hirschhorn	IMM	Promueve la fragmentación mitocondrial
SUMO1	SUMOylating	Cytosolic	Activa a Drp1 por sumoylation
SEN3	deSUMOylating	Cytosolic	deSUMOylating Drp1 y la activa
Calpain	Proteólisis	Cytosolic	Proteasa que se activa por subida Ca <sup>2+</sup> y corta MEF2, NMDA, nNOS, calcineurina, CaMK, spectrina, etc
ROS	Estrés oxidativo	Celular	Mal estar general
Toxina 3-NP	Toxinas	Mitocondrial	Inhibe a SDH (complejo 2 cadena respiratoria) y activa cdk5
Cocaina	Drogas	Celular	Inhibe MEF2
Ethanol	Drogas	Celular	Inhibe MEF2

---

## ANEXO 2

Artículo publicado en *The EMBO Journal*

---

SOURCE  
DATATRANSPARENT  
PROCESS

# Mfn2 downregulation in excitotoxicity causes mitochondrial dysfunction and delayed neuronal death

Alejandro Martorell-Riera<sup>1,2</sup>, Marc Segarra-Mondejar<sup>1,2</sup>, Juan P Muñoz<sup>3,4,5</sup>, Vanessa Ginet<sup>6,7</sup>, Jordi Olloquequi<sup>8</sup>, Jesús Pérez-Clausell<sup>1</sup>, Manuel Palacín<sup>3,4</sup>, Manuel Reina<sup>1,2</sup>, Julien Puyal<sup>6,7</sup>, Antonio Zorzano<sup>3,4,5</sup> & Francesc X Soriano<sup>1,2,\*</sup>

## Abstract

Mitochondrial fusion and fission is a dynamic process critical for the maintenance of mitochondrial function and cell viability. During excitotoxicity neuronal mitochondria are fragmented, but the mechanism underlying this process is poorly understood. Here, we show that Mfn2 is the only member of the mitochondrial fusion/fission machinery whose expression is reduced in *in vitro* and *in vivo* models of excitotoxicity. Whereas in cortical primary cultures, Drp1 recruitment to mitochondria plays a primordial role in mitochondrial fragmentation in an early phase that can be reversed once the insult has ceased, Mfn2 downregulation intervenes in a delayed mitochondrial fragmentation phase that progresses even when the insult has ceased. Downregulation of Mfn2 causes mitochondrial dysfunction, altered calcium homeostasis, and enhanced Bax translocation to mitochondria, resulting in delayed neuronal death. We found that transcription factor MEF2 regulates basal Mfn2 expression in neurons and that excitotoxicity-dependent degradation of MEF2 causes Mfn2 downregulation. Thus, Mfn2 reduction is a late event in excitotoxicity and its targeting may help to reduce excitotoxic damage and increase the currently short therapeutic window in stroke.

**Keywords** excitotoxicity; mitochondrial dynamics; neuron; transcriptional regulation

**Subject Categories** Autophagy & Cell Death; Neuroscience; Membrane & Intracellular Transport

**DOI** 10.15252/emj.201488327 | Received 25 February 2014 | Revised 21 July 2014 | Accepted 24 July 2014

## Introduction

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system. It plays an essential role in development, synaptic plasticity, and neuronal survival but sustained elevated levels of extracellular glutamate kill neurons in a process called excitotoxicity (Arundine & Tymianski, 2003). Excitotoxicity takes place in both chronic neurological diseases, such as Huntington's and Alzheimer's disease, and in acute episodes such as traumatic brain injury and ischemic stroke. The NMDA receptor (NMDAR) is the main ionotropic glutamate receptor in the CNS and the excessive flux of Ca<sup>2+</sup> that passes through it is a major cause of excitotoxicity. Despite evidence indicating a crucial role of NMDAR activation in brain damage during stroke, clinical trials with NMDAR blockers have failed because of poor tolerance and efficacy (Ikonomidou & Turski, 2002; Muir, 2006). In contrast to excessive NMDAR activity that causes cell death, its physiological activity triggers pro-survival signals that may play a role in promoting recovery and preventing delayed neuronal loss in the penumbra (Ikonomidou & Turski, 2002; Lo, 2008). Thus, future therapies to reduce excitotoxicity must target pro-death events downstream of NMDAR without affecting the pro-survival signals. Several mechanisms are implicated in cell death triggered by Ca<sup>2+</sup> influx through NMDAR. Mitochondrial dysfunction caused by excessive Ca<sup>2+</sup> uptake acts as a signaling hub for many pro-death events (Reynolds & Hastings, 1995; Stout *et al*, 1998; Almeida *et al*, 1999; Yu *et al*, 2002; Soriano *et al*, 2008).

Mitochondria are dynamic organelles that constantly fuse and divide, changing shape and localization. The equilibrium between fission and fusion is important for mitochondrial function, which is not only limited to supplying energy to the cell, but also intervenes in anabolic and catabolic biochemical pathways and the regulation

1 Department of Cell Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

2 CELLTEC-UB, University of Barcelona, Barcelona, Spain

3 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

4 Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Barcelona, Spain

5 CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

6 Department of Fundamental Neurosciences, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

7 Clinic of Neonatology, Department of Pediatrics and Pediatric Surgery, University Hospital Center and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

8 Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Talca, Chile

\*Corresponding author. Tel: +34 934029046; Fax: +34 934034607; E-mail: f.x.soriano@ub.edu

of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, and is a key regulator of cell death progression. The core mitochondrial fusion and fission machineries are formed by a group of dynamin-related large GTPases (Liesa *et al*, 2009; Westermann, 2010).

Inner mitochondrial membrane fusion is mediated by Opa1. Two mitofusins (Mfn), Mfn1 and 2, mediate mitochondrial outer membrane fusion. Mfn1 and Mfn2 display high homology (81%) and around 60% identity, but nonetheless they have non-redundant roles (de Brito & Scorrano, 2008b; Liesa *et al*, 2009). In addition to its fusion role, Mfn2 localization in the ER is necessary to maintain the reticular morphology of the ER and control the ER–mitochondria interaction (de Brito & Scorrano, 2008a). Mfn2 may also play a role in neuronal mitochondrial trafficking, and disruption of this function can lead to axon degeneration (Baloh *et al*, 2007; Misko *et al*, 2012). Mitochondrial fission is mediated by Drp1. Drp1 is mainly cytoplasmic and its translocation to mitochondria, recruited by Fis1 and/or Mff, is essential for mitochondrial fission. Drp1 is subjected to several posttranscriptional modifications, including phosphorylation, ubiquitination, SUMOylation and nitrosylation, which can either activate or repress fission activity (Cho *et al*, 2010; Ottinghaus *et al*, 2012).

Although mitochondrial fission per se does not cause cell death, fragmentation of mitochondria has been shown to play a key role in cell death progression. Mitochondrial fragmentation occurs early in apoptosis and can be delayed by expressing a dominant-negative Drp1 (Frank *et al*, 2001; Breckenridge *et al*, 2003). Recently, Drp1 has also been implicated in the induction of necrosis (Wang *et al*, 2012). Mutations in Mfn2 are the most commonly identified cause of Charcot-Marie-Tooth type 2 (CMT2), a dominantly inherited disease characterized by degeneration of peripheral sensory and motor axons (Zuchner *et al*, 2004). Purkinje cells require Mfn2 but not Mfn1 for dendritic outgrowth, spine formation, and cell survival (Chen *et al*, 2007). Mitochondrial fragmentation is an early event that occurs before the release of mitochondrial proteins and neurite degeneration in an *in vivo* animal model of stroke (Barsoum *et al*, 2006). Despite the importance of mitochondrial dynamics in cell death progression, the exact mechanism that underlies the mitochondrial fragmentation in excitotoxicity is incompletely understood. In this study, we assessed how the proteins of the core mitochondrial fusion/fission machinery are regulated in excitotoxicity. We found that Mfn2 levels are reduced in both *in vitro* and *in vivo* models of excitotoxicity, via MEF2 degradation that, by acting on the Mfn2 promoter, regulates basal levels of Mfn2. Downregulation of Mfn2 causes mitochondrial dysfunction and altered  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and facilitate Bax recruitment to mitochondria during excitotoxicity.

## Results

### Mfn2 protein expression is reduced in excitotoxicity

Mitochondrial dynamics plays a pivotal role in cell death. Changes in mitochondrial morphology have been observed in excitotoxicity, but the precise mechanism has not been fully defined. For a better understanding of the mechanism by which mitochondria are fragmented during excitotoxicity, we exposed primary cortical cultures to moderate doses (30  $\mu\text{M}$ ) of the glutamate receptor agonist NMDA

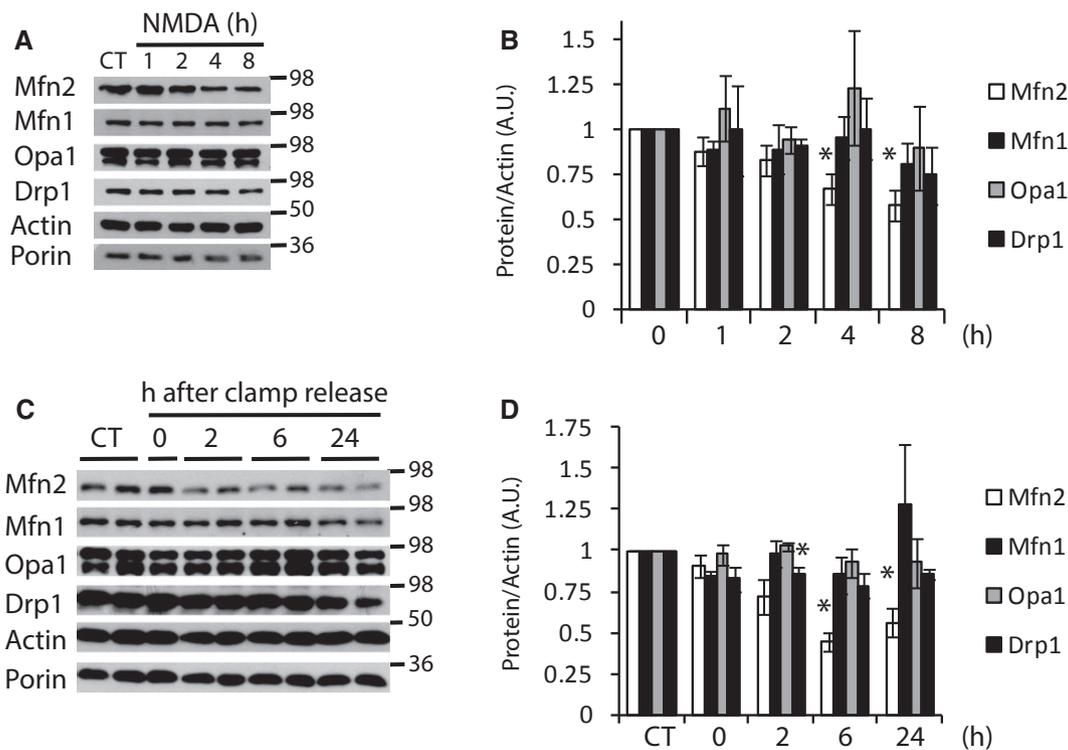
over a time course of 1, 2, 4, and 8 h and analyzed the expression of the proteins of the mitochondrial fission/fusion machinery. During the first 2 h after NMDA application, there were no significant changes in either fusion or fission proteins, but after 4 h of NMDA treatment, we observed a 40% reduction in the fusion protein Mfn2 with no changes in the other fusion proteins, Mfn1 and Opa1. Surprisingly, Drp1 showed a tendency to reduce its protein levels (Fig 1A and B). To rule out the possibility that changes in the expression of mitochondrial fission/fusion protein were due to changes in mitochondrial mass, volume normalization was also performed with the mitochondrial protein porin, achieving similar results (Supplementary Fig S1A). Using oxygen and glucose deprivation (OGD) as another *in vitro* model of excitotoxicity, we also found that the level of Mfn2 was reduced 4 h after reoxygenation with no changes in the other proteins of the fission/fusion machinery (Supplementary Fig S1B and C).

To check the pathophysiological relevance of these *in vitro* findings, we then used an *in vivo* model of cerebral ischemia in 12-day-old rats consisting in applying a permanent middle cerebral artery occlusion combined with 90 min of transient occlusion of the ipsilateral common carotid artery (Vaslin *et al*, 2009). During an ischemic episode, glutamate levels build up as a result of synaptic release and impaired and/or reversed uptake mechanisms (Camacho & Massieu, 2006), which induces excessive activation of NMDA glutamate receptors (NMDARs) and  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated cell death (Arundine & Tymianski, 2003). We analyzed the expression of the mitochondrial fusion/fission machinery at several time points after the ischemic insult. The results were in the same trend to those found *in vitro*. Two hours after restoration of the common carotid artery blood flow, that is 3.5 h after the ischemia onset, Mfn2 protein levels started to decline and reached a significant 50% reduction 6 h after the restoration of the common carotid artery blood flow (Fig 1C and D, and Supplementary Fig S1D). Drp1 also showed a slight but significant reduction (20%) 2 h after the restoration of blood flow. Neither of the other mitochondrial fusion proteins (Mfn1 and Opa1) showed changes in levels during the 24 h after the onset of ischemia. Thus, our *in vitro* neuronal cultures recapitulate well the excitotoxic *in vivo* model.

### Activation of Drp1 induces mitochondrial fragmentation

We observed the downregulation of Mfn2 4 h after initiating the insult, but nonetheless the kinetics of excitotoxicity-mediated mitochondrial fragmentation has been reported to be fast (Rintoul *et al*, 2003; Barsoum *et al*, 2006; Young *et al*, 2010). To clarify this, we analyzed the mitochondrial morphology of those neurons expressing RFP targeted to the mitochondrial matrix (mtRFP) that were still alive (as shown by nuclear DAPI staining; Supplementary Fig S2A) after NMDA treatment of different durations. Untreated neurons contained mainly well-connected tubular mitochondria (60%). After only 30–60 min of NMDA application most of the neurons contained globular mitochondria that remained intact for the following 2 h with a small amount of additional fragmentation 4 h after NMDA treatment (Fig 2A and B). Although the secondary fragmentation correlates with the diminished Mfn2 expression, it is unlikely that Mfn2 is responsible for the first and early phase of mitochondrial fragmentation.

We observed a tendency for a decline in the level of Drp1 in excitotoxicity (Fig 1). Nonetheless, what determines Drp1 activity is



**Figure 1. Mfn2 expression is reduced in excitotoxicity *in vitro* and *in vivo*.**

A, B Western analysis of mitochondrial fusion/fission proteins from *in vitro* primary cortical neurons exposed to NMDA (30  $\mu$ M) for the indicated times and densitometric analysis normalized to actin ( $n = 3-6$ ).

C, D Western analysis of mitochondrial fusion/fission proteins from *in vivo* brain extracts of rats subjected to MCAO plus 90 min of ipsilateral common carotid artery clamp followed by clamp release for the indicated times and densitometric analysis normalized to actin ( $n = 3-7$ ).

Data information: Results are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared to control, two-tailed *t*-test.

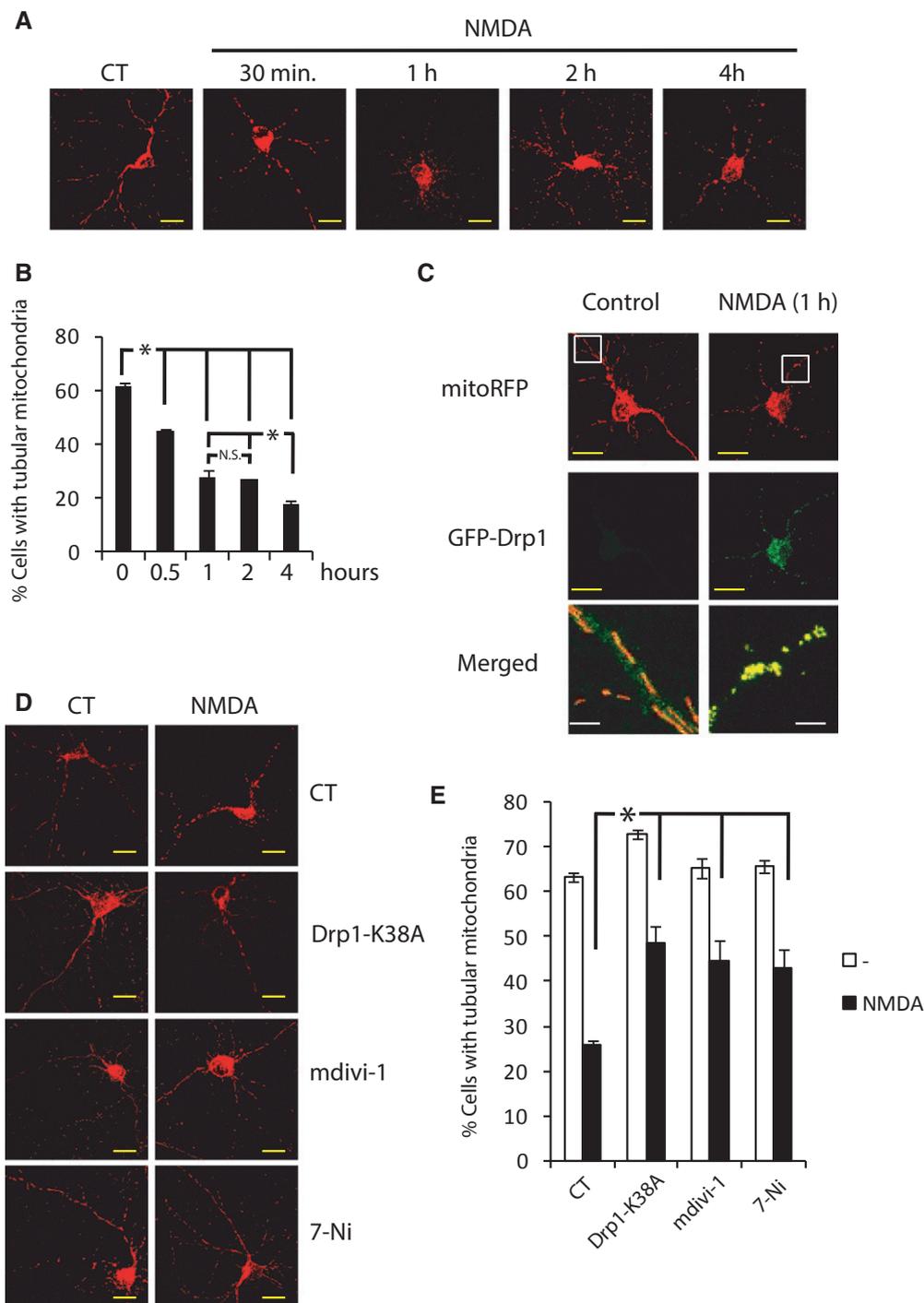
Source data are available online for this figure.

its subcellular localization. Drp1 is mainly cytosolic, and by post-translational modifications, it is recruited to the mitochondria by Mff and/or Fis1 where it promotes fission (James *et al*, 2003; Yoon *et al*, 2003; Gandre-Babbe & van der Bliek, 2008; Otera *et al*, 2010). In basal conditions, GFP-Drp1 transfected neurons showed a weak diffuse signal within the neuron. Application of NMDA for 1 h produced a strong punctuate signal that co-localized with mitochondria (Fig 2C). Overexpression of a mutant form of Drp1 (Drp1-K38A), which acts as a dominant negative (Smirnova *et al*, 1998), or using the Drp1 inhibitor mdivi-1, significantly attenuated the NMDA-mediated mitochondrial fragmentation during the first hour of NMDA treatment (Fig 2D and E). Excessive calcium uptake by mitochondria in excitotoxicity causes mitochondrial depolarization (Soriano *et al*, 2006b; Nicholls, 2009), this produces an increase in cytosolic calcium that can activate calcineurin which has been shown to de-phosphorylate Drp1 to promote its recruitment to mitochondria and fission (Cereghetti *et al*, 2008). We analyzed whether mitochondrial fission preceded or was posterior to mitochondrial depolarization. We found that 1 min before fission mitochondria have lost 60% of the mitochondrial membrane potential, which continues to dissipate progressively after fission (Supplementary Fig S2B and C). We next analyzed the possible involvement of calcineurin in the NMDA-mediated mitochondrial fission. Inhibition of calcineurin with cyclosporine A (CsA) did not

prevent mitochondrial fission (Supplementary Fig S2D) as neither did the inhibition of CaMK, a calcium-dependent kinase that activates Drp1 (Han *et al*, 2008), with KN-62. Drp1 is also activated by nitrosylation (Cho *et al*, 2009). As it had been reported previously (Barsoum *et al*, 2006; Cho *et al*, 2009), here, we also showed that inhibition of the nitric oxide synthase with 7-nitroindazole (7-Ni) blocked the mitochondrial fragmentation to the same extent as the mutant Drp1-K38A or mdivi-1 (Fig 2E). These experiments indicate that NO-mediated Drp1 activation plays a key role in mitochondrial fragmentation during excitotoxicity, although other mechanisms may also be involved.

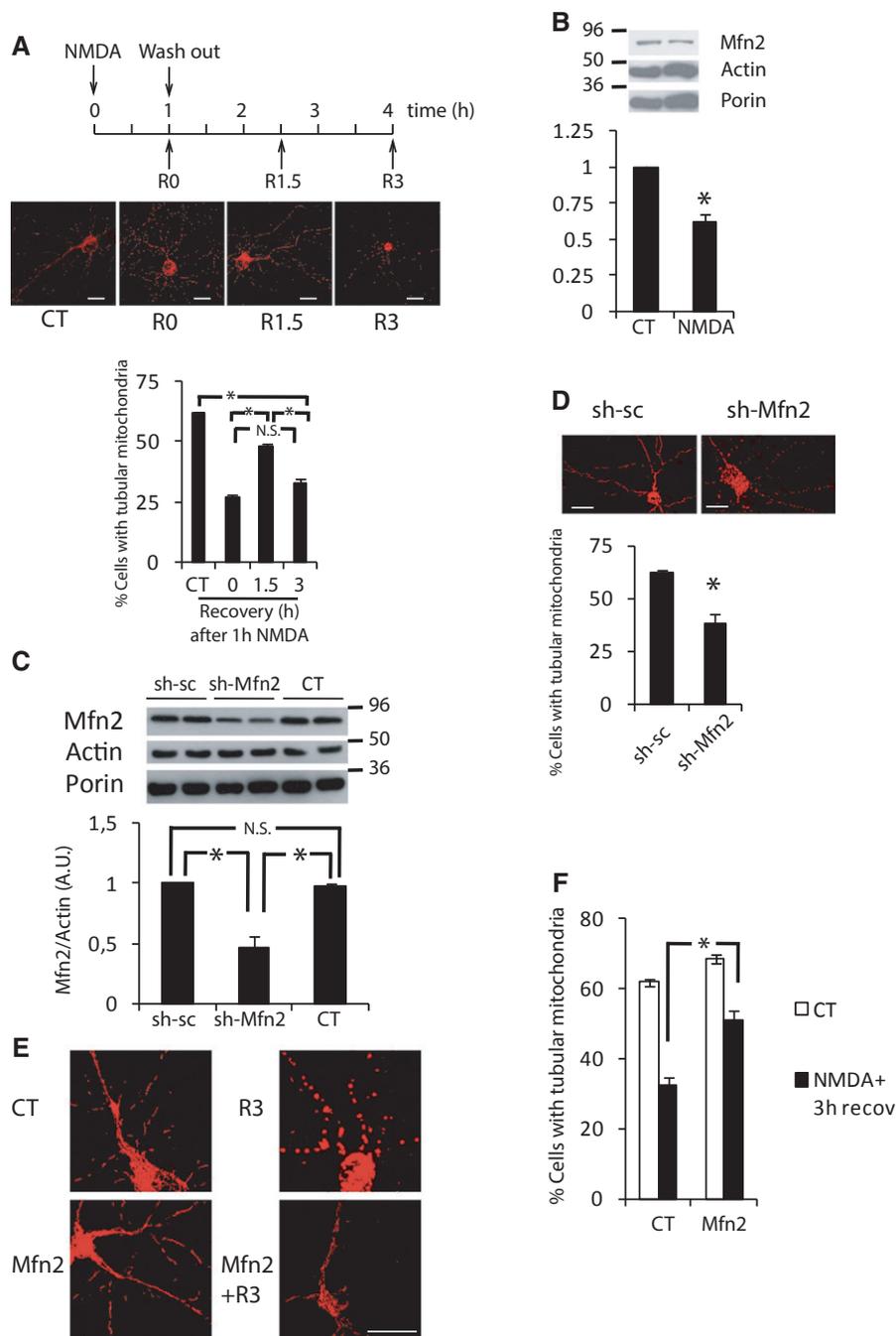
### Mfn2 intervenes in an irreversible late phase of mitochondrial fragmentation

Previous studies have shown that glutamate and nitric oxide mediated mitochondrial fragmentation are amenable to restoration once the stimulus has ceased (Rintoul *et al*, 2003; Barsoum *et al*, 2006). Thereby, we decided to test the reversibility of mitochondrial morphology in our system. We applied NMDA for 1 h and then washed out the NMDA and returned to fresh media. We observed that the mitochondrial tubular morphology was recovered 90 min after replacing the media but that after 180 min the mitochondria fragmented once again (Fig 3A). The events that triggered the



**Figure 2. Activation of Drp1 induces mitochondrial fragmentation.**

- A Representative images of NMDA-induced mitochondrial fragmentation. Neurons transfected with mitochondria-targeted RFP (mtRFP) were treated with NMDA (30  $\mu$ M) for the indicated times. Scale bar, 20  $\mu$ m.
- B Mitochondrial morphology analysis from (A) ( $n = 3-8$ ). \* $P < 0.05$  compared to control, one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Results are presented as mean  $\pm$  SEM.
- C NMDA induces increased Drp1 translocation to mitochondria. Neurons were transfected with plasmids encoding GFP-Drp1 and mtRFP. After 48 h, neurons were stimulated with NMDA (30  $\mu$ M) for 1 h or left unstimulated, fixed, and visualized under a confocal microscope. Brightness and contrast has been adjusted in the merged image to visualize GFP signal in the control condition. Scale bar, yellow = 20  $\mu$ m, white = 4  $\mu$ m.
- D, E Representative images showing that genetic and pharmacological inhibitors of Drp1 block mitochondrial fragmentation (D). Neurons were transfected with plasmids encoding mtRFP and Drp1-K38A or control (globin). After 48 h, neurons were stimulated with NMDA (30  $\mu$ M) for 1 h or they were pre-treated for 1 h before NMDA stimulation with mdivi-1 (25  $\mu$ M) or 7-nitroindazole (7-Ni at 5  $\mu$ M in Arg-free medium) and mitochondrial morphology was analyzed (E). ( $n = 3$ ). Scale bar, 20  $\mu$ m. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.



**Figure 3. Mfn2 intervenes in an irreversible delayed phase of mitochondrial fragmentation.**

- A** Representative images and analysis of secondary mitochondrial fragmentation after NMDA washout. Neurons were transfected with mtRFP. After 48 h, neurons were stimulated with NMDA (30  $\mu$ M) for 1 h and washed out for the indicated times and mitochondrial morphology was analyzed ( $n = 4-5$ ). \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Scale bar, 20  $\mu$ m.
- B** Mfn2 is reduced after NMDA washout. Western blot and densitometric analysis of neurons treated with NMDA (30  $\mu$ M) for 1 h and washed out for three additional hours ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ , two-tailed *t*-test.
- C** Representative Western blot and densitometric analysis of neurons transduced with AAV producing shRNA against Mfn2 or scrambled ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.
- D** Mfn2 knockdown causes mitochondrial fragmentation. Representative images and analysis of mitochondrial morphology of neurons transfected with plasmids shMfn2 or sh-sc and mtRFP ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ , two-tailed *t*-test. Scale bar, 20  $\mu$ m.
- E, F** Mfn2 blocks the delayed phase of NMDA-induced mitochondrial fragmentation. Representative images of neurons transfected with plasmids encoding mtRFP and Mfn2 or globin (CT) were treated with NMDA (30  $\mu$ M) for 1 h and washed out for three additional hours (E) and mitochondrial morphology was analyzed (F) ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Scale bar, 20  $\mu$ m.

Data information: Results are presented as mean  $\pm$  SEM.

Source data are available online for this figure.

decline in Mfn2 levels began during the first hour of NMDA exposure since subsequent washout of the agonist did not block the reduction in Mfn2 (Fig 3B). Because the delayed phase of mitochondrial fragmentation correlates with the reduction in Mfn2 protein levels (Figs 1A, 2B and 3A and B), we reasoned that the reduction in Mfn2 levels in excitotoxicity intervenes in late mitochondrial fission. We knocked down Mfn2 using shRNA, which targets its sequence (shMfn2). Importantly, shMfn2 reduced Mfn2 protein levels by around 50%, resembling the reduction observed in excitotoxicity (Fig 3C). As expected, knockdown of Mfn2 was sufficient to cause mitochondrial fragmentation (Fig 3D). Another two shRNAs targeting Mfn2 at different sequences also showed mitochondrial fragmentation (Supplementary Fig S3A and B). Conversely, exogenous expression of Mfn2 significantly blocked the late phase of mitochondrial fragmentation after NMDA washout (Fig 3E and F).

All of this indicates that excitotoxicity promotes mitochondrial fragmentation by at least two mechanisms, a fast mechanism relying on Drp1 activation that lasts while the insult is present, and a late mechanism dependent on the reduction in Mfn2 expression that takes place hours after the insult is generated and persists independently of the removal of the insult.

### Reduced Mfn2 expression causes mitochondrial dysfunction and altered $\text{Ca}^{2+}$ homeostasis

In addition to its mitochondrial fusion activity, Mfn2 has unique properties, which are not shared with Mfn1, such as activating mitochondrial oxidative metabolism or tethering of mitochondria with the ER regulating  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Bach *et al*, 2003; Pich *et al*, 2005; Baloh *et al*, 2007; de Brito & Scorrano, 2008a). Since mitochondrial dysfunction and altered  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis are hallmarks of excitotoxicity, we wondered how decreased levels of Mfn2 could affect mitochondrial function. Respirometric assays showed decreased respiratory control ratio (RCR) and spare respiratory capacity (SRC) in Mfn2 KD neurons (Fig 4A and B). Determination of mitochondrial membrane potential showed that mitochondria in Mfn2 KD neurons had 15% lower mitochondrial membrane potential than control transfected cells (Fig 4C), in concordance with what has been observed in other cell types (Bach *et al*, 2003; Soriano *et al*, 2006a). In agreement with lower SRC, when neurons were challenged with subtoxic doses of NMDA (15  $\mu\text{M}$ ) mitochondrial membrane potential loss was greatly enhanced in Mfn2 KD neurons (Fig 4C). Concomitantly, when the culture medium was changed to a medium with pyruvate but without glucose just before the NMDA application (to rely solely on mitochondrial metabolism), ATP levels decreased significantly in Mfn2 KD neurons (Fig 4D). All together, these results indicate an impaired mitochondrial function in the Mfn2 KD neurons.

Because mitochondria play a key role in buffering the increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  produced during excitotoxicity, which depends on proper mitochondrial membrane potential (Nicholls, 2009), we reasoned that  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis may be impaired in Mfn2 KD neurons. We measured mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  with Rhodamine-2 (Rhod-2). Under basal conditions, Mfn2 KD neurons have a slightly lower ( $9.9 \pm 3.52\%$ ) mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration than control neurons (Fig 4E and F). The application of NMDA produced a lower increase of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  in the Mfn2 KD neurons than in the control neurons (Fig 4E and F). Because Rhod-2 localization to

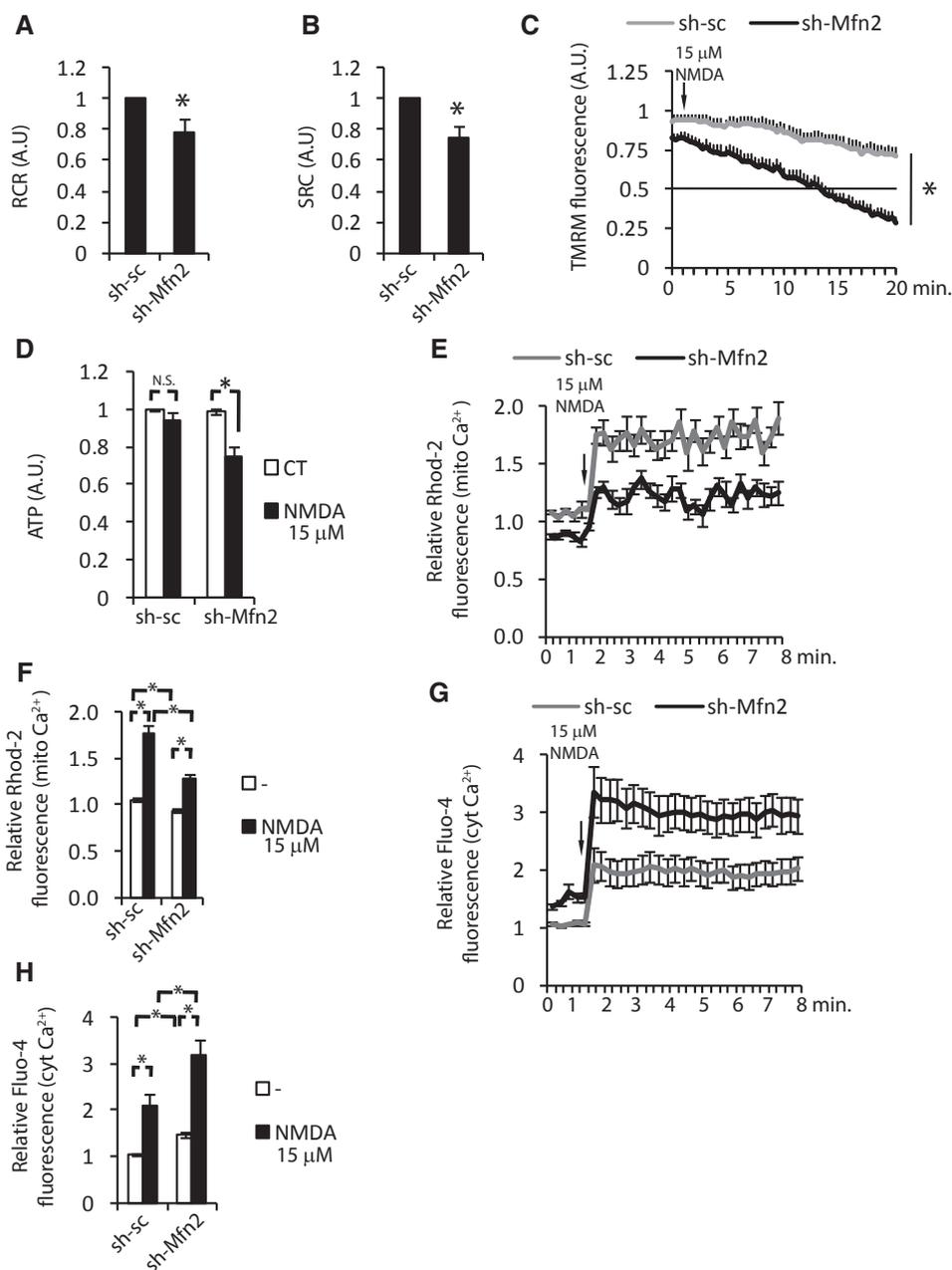
mitochondria is voltage sensitive and lower mitochondrial membrane potential could lead to reduced Rhod-2 fluorescence, we also analyzed cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and we found that, oppositely to mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ , cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  was moderately higher in Mfn2 KD neurons and NMDA application produced bigger increase in Mfn2 KD neurons (Fig 4G and H, and Supplementary Fig S4A). Increase in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  was due to reduced mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake since depolarization of mitochondria with CCCP, hence abolishment of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, produced the same increase in NMDA-mediated rise in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in control or Mfn2 KD neurons (Supplementary Fig S4B).

Together, these data support the notion that a reduction in Mfn2 causes mitochondrial malfunction, which causes disturbances in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis.

### Mfn2 reduction intervenes in delayed excitotoxic death

Given that reduced levels of Mfn2 had a great impact on mitochondrial membrane potential and  $\text{Ca}^{2+}$  handling when neurons were treated with low doses of NMDA, next we investigated whether the reduction in Mfn2 could have consequences for cell viability. We showed that this was indeed the case, as knockdown of Mfn2 sensitized neurons to subtoxic doses of NMDA (Fig 5A). Another two shRNAs targeting Mfn2 at different sequences also showed sensitization to subtoxic doses of NMDA, ruling out the possibility of an off-target effect (Supplementary Fig S5A). Next, we overexpressed Mfn2 and observed an almost twofold protection to the NMDA-induced neuronal death (Fig 5B). The protection was not due to the restoration of mitochondrial morphology since overexpression of Mfn1 did not show significant protection to NMDA (Supplementary Fig S5B). Shortly after exposure to glutamate, a subpopulation of neurons died by necrosis. Surviving neurons can recover or transiently and undergo delayed cell death, depending on mitochondrial function (Ankarcrona *et al*, 1995; Luetjens *et al*, 2000). We studied how exogenous expression of Mfn2 could affect the different phases of excitotoxic cell death. We determined cell death after an hour treatment with NMDA (30  $\mu\text{M}$ ) followed by the washout of NMDA and allowed the neurons to recover for different length of time. After 1.5 h recovery (i.e. 2.5 h from the onset of the insult), nearly 40% of the neurons died with no protection by Mfn2 expression. From then on, and correlating with endogenous Mfn2 reduction, cell death in the neurons that were transfected with the control vector increased progressively, but Mfn2 expression completely blocked the delayed cell death (Fig 5C).

Given that several mechanisms are responsible for the NMDA-mediated cell death, to better characterize the mechanism by which reduction of Mfn2 causes delayed excitotoxicity we used NMDA at 15  $\mu\text{M}$ , which only causes death when Mfn2 is knocked down (Fig 5A). Analysis of the  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio as a readout of the metabolic status of the neuron did not indicate that an energetic collapse was responsible for the neuronal death when Mfn2 expression was reduced (Supplementary Fig S5C). Evidences indicate that opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and necrotic death occurs during the early phase of excitotoxicity as opposed to apoptosis that occurs in delayed excitotoxicity (Dirnagl *et al*, 1999). Consequently, inhibition of the mPTP with CsA failed to protect Mfn2 KD neurons to low doses of NMDA (15  $\mu\text{M}$ ; Supplementary Fig S5D). During delayed



**Figure 4. Mfn2 downregulation causes mitochondrial dysfunction and altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis.**

A, B Respiratory control ratio (A) and spare respiratory capacity (B) of neurons transduced with AAV expressing shRNA targeting Mfn2 (sh-Mfn2) or scrambled (sh-sc) ( $n = 6$ ). \* $P < 0.05$ , two-tailed  $t$ -test.

C Loss of mitochondrial membrane potential in neurons transfected with sh-Mfn2 or sh-sc and treated with NMDA (15  $\mu$ M; arrow) was determined by measuring TMRM fluorescence. The values were normalized to surrounding untransfected neurons ( $n = 19$ –21 neurons analyzed in five independent experiments). \* $P < 0.05$ , two-tailed  $t$ -test.

D ATP levels were analyzed following 30-min NMDA (15  $\mu$ M) treatment to neurons transduced with AAV producing sh-Mfn2 or control sh-sc (in glucose-free medium) ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ , two-tailed  $t$ -test.

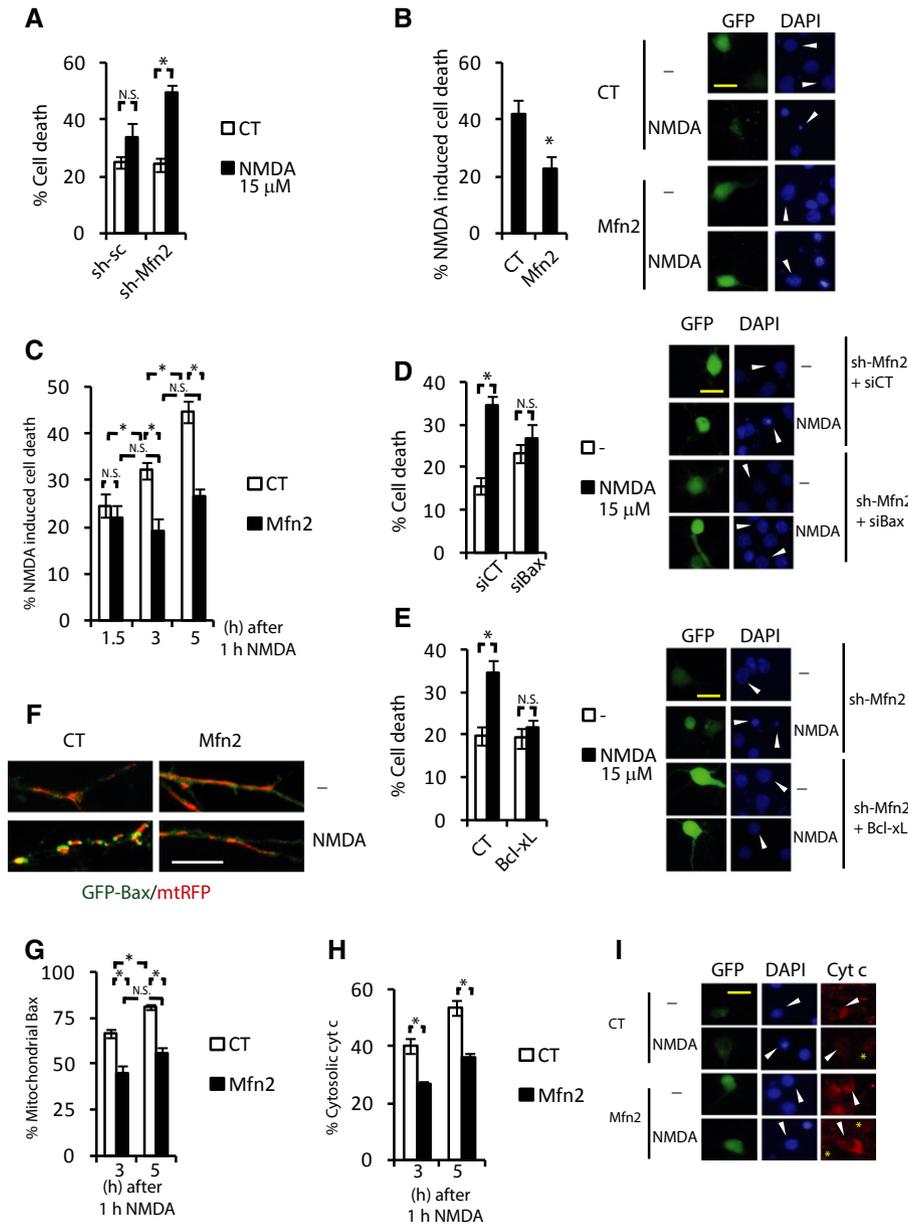
E Determination of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> with Rhodamine-2 in cortical neurons transfected with plasmids producing sh-Mfn2 or sh-sc and treated with NMDA (15  $\mu$ M), the values were normalized to the signal of surrounding untransfected neurons ( $n = 20$  neurons from five independent experiments).

F Histograms showing the average mitochondrial Ca<sup>2+</sup> levels before and after NMDA application (15  $\mu$ M). \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

G Determination of intracellular Ca<sup>2+</sup> with Fluo-4 in cortical neurons transfected with plasmids producing sh-Mfn2 or sh-sc and treated with NMDA (15  $\mu$ M), the values were normalized to the signal of surrounding untransfected neurons ( $n = 16$  neurons from 4 independent experiments).

H Histograms show the average intracellular Ca<sup>2+</sup> levels before and after NMDA application (15  $\mu$ M). \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

Data information: Results are presented as mean  $\pm$  SEM.



**Figure 5. Mfn2 reduction intervenes in delayed excitotoxic death.**

**A** Neurons transfected with plasmids expressing sh-Mfn2 or sh-sc were treated with subtoxic doses of NMDA (15 μM) for 6 h. Death was analyzed by fixing cells, DAPI staining and counting pyknotic nuclei of the transfected neurons ( $n = 5$ ).  $*P < 0.05$ , two-tailed  $t$ -test.

**B** Analysis and representative images of cortical neurons transfected with plasmids expressing Mfn2 or control (globin). After 48 h, neurons were exposed to NMDA (30 μM) for 6 h. NMDA-dependent neuronal death was analyzed ( $n = 8$ ).  $*P < 0.05$ , two-tailed  $t$ -test. Arrowhead points to the transfected neuron. Scale bar, 20 μm.

**C** Cortical neurons expressing Mfn2 or control plasmid (globin) were treated with 30 μM NMDA for 1 h followed by extensive washout and were allowed to recover for the indicated times. Cell death was analyzed by fixing cells, DAPI staining, and counting pyknotic nuclei of the transfected neurons ( $n = 5$ ).  $*P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

**D, E** Representative images and cell death analysis of neurons transfected with a plasmid producing sh-Mfn2 plus (D) siRNA CT or targeting Bax, or (E) plasmid control or expressing Bcl-xL and treated with NMDA (15 μM) for 6 h ( $n = 8$ ).  $*P < 0.05$ , two-tailed  $t$ -test. Arrowhead points to the transfected neuron. Scale bar, 20 μm.

**F** Representative images of neurons expressing GFP-Bax and mtRFP plus control or Mfn2 expression vector and treated with NMDA (30 μM) for 1 h followed by extensive washout and were allowed to recover for the 3 h. Scale bar, 10 μm.

**G** Analysis of mitochondrial Bax localization of neurons transfected as in (F) and allowed to recover after NMDA treatment (30 μM) for the indicated times ( $n = 3-5$ ).  $*P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

**H, I** The cellular localization of cytochrome c was analyzed in neurons transfected with GFP plus control or Mfn2-expressing plasmid and treated as in (G) ( $n = 5$ ).  $*P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Representative images are shown in (I). Arrowhead points to the transfected neuron, asterisk highlights cells with diffuse or lost cytochrome c. Scale bar, 20 μm.

Data information: Results are presented as mean ± SEM.

excitotoxic cell death Bax translocates to mitochondria to produce the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) (Xiang *et al*, 1998; D'Orsi *et al*, 2012; Shelat *et al*, 2013). Bax is known to interact with Mfn2 (Karbowski *et al*, 2006; Brooks *et al*, 2007), and Mfn2 interferes with Bax activation (Sugioka *et al*, 2004; Neuspiel *et al*, 2005). Bax siRNA blocked the NMDA-dependent neuronal death in Mfn2 KD neurons (Fig 5D). In addition, overexpression of the anti-apoptotic Bcl-xL protein also blocked the neuronal death (Fig 5E). In agreement with the reported activation of calpain downstream of Bax activation (D'Orsi *et al*, 2012), by measuring cleavage of spectrin (calpain substrate), we observed an enhanced calpain activation in Mfn2 KD neurons (Supplementary Fig S5E). According to the role of Bcl-2 family proteins regulating mitochondrial dynamics by using siBax and Bcl-xL, overexpression partially prevented the delayed mitochondrial fragmentation after NMDA application (Supplementary Fig S5F and G).

Next, we studied whether exogenous expression of Mfn2 affected Bax translocation to mitochondria in excitotoxicity. We observed that in GFP-Bax expressing neurons Bax was mainly cytoplasmic and that NMDA (30  $\mu$ M) application resulted in Bax translocation to mitochondria, forming the typical foci on the tips of the mitochondria (Karbowski *et al*, 2002; Yuan *et al*, 2006; Fig 5F). Bax translocation to mitochondria was progressive after NMDA treatment and Mfn2 expressing neurons showed less mitochondrial Bax than globin (control) expressing neurons (Fig 5F and G). As expected, NMDA-mediated delayed cytochrome c release was blocked by Mfn2 expression in a similar pattern to mitochondrial Bax localization (Fig 5H and I).

All these data indicate that the late reduction of Mfn2 levels impairs mitochondrial function and enhances delayed excitotoxic death by promoting Bax recruitment to mitochondria.

### Mfn2 is regulated at the transcriptional level in excitotoxicity

Next, we investigated the mechanism by which Mfn2 expression is reduced in excitotoxicity. It is well known that Mfn2 is degraded by the proteasome in a Parkin-dependent manner (Tanaka *et al*, 2010; Chan *et al*, 2011). We wondered whether the decrease in Mfn2 levels in excitotoxicity was due to its proteasomal degradation. Surprisingly, we found that pretreatment of neurons with the proteasome inhibitor MG-132 did not abolish the NMDA-dependent reduction in Mfn2 (Fig 6A and B) even when the concentration of MG-132 used (10  $\mu$ M) promoted the accumulation of ubiquitinated proteins and effectively blocked the CCCP-mediated degradation of Mfn2 (Supplementary Fig S6A and B). Therefore, we can conclude that excitotoxic-dependent downregulation of Mfn2 is not dependent on proteasomal degradation.

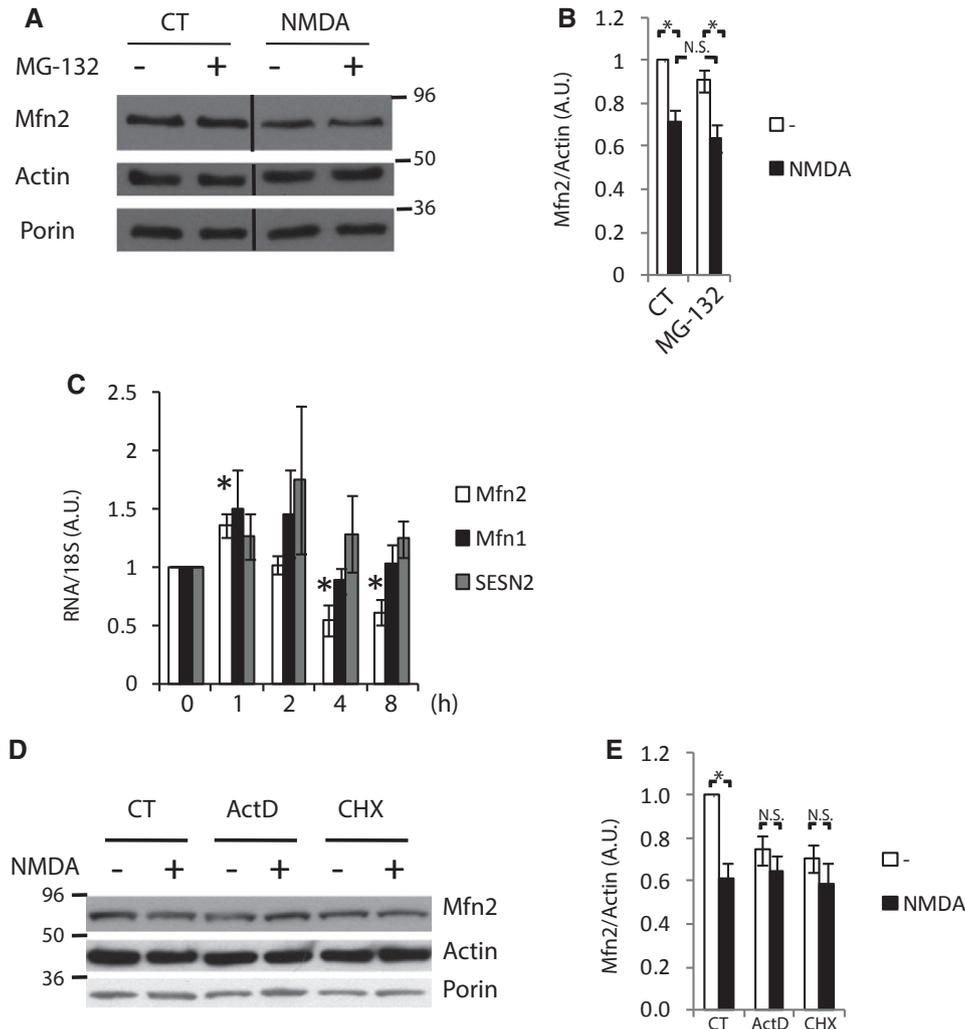
Excitotoxicity causes changes in transcriptional programs (Zhang *et al*, 2007; Cook *et al*, 2012), which could be consistent with the slow effect of NMDA on Mfn2 expression. We investigated whether Mfn2 reduction was due to changes in its gene expression. Mfn2 gene expression showed an initial increase during the first hour after NMDA application, probably a defensive response to malfunctioning mitochondria. Mfn2 gene expression started to decrease during the second hour, reaching a plateau after 4 h that remained steady for up to 8 h of treatment and correlated with the time course of protein expression (Fig 6C). Neurons subjected to OGD also showed downregulation of Mfn2 mRNA expression (Supplementary Fig S6C).

The repression of Mfn2 expression is specific since mitochondrial Mfn1 and cytoplasmic SESN2 expression were not affected by NMDA treatment (Fig 6C). These data indicate that Mfn2 gene expression is downregulated during excitotoxicity, but do not rule out the possibility that other proteases could participate in the excitotoxicity-mediated reduction in Mfn2. To verify that a transcriptional change is the main mechanism by which Mfn2 expression is reduced in excitotoxicity, we used the transcriptional inhibitor actinomycin D or the translational inhibitor cycloheximide. As expected, the use of these inhibitors reduced Mfn2 protein levels but additional application of NMDA did not produce a further reduction in Mfn2, as would be expected if a proteolytic process was responsible for NMDA-mediated Mfn2 downregulation (Fig 6D and E). Thus, all these sets of experiments clearly indicate that the main mechanism by which NMDA mediates Mfn2 downregulation is at the transcriptional level rather than being a proteolytic process.

### Excitotoxicity-mediated Mfn2 downregulation depends on MEF2

ROS is an important regulator of cell signaling (Holmstrom & Finkel, 2014). We first examined whether mitochondrial ROS produced in excitotoxicity could mediate Mfn2 downregulation. The use of general scavenger trolox, or apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, which is the major source of ROS in excitotoxicity (Brennan *et al*, 2009), failed to block NMDA-mediated Mfn2 downregulation (Supplementary Fig S7A).

MEF2 (A–D) are transcription factors that play an important role in neuronal development and viability (Mao *et al*, 1999; Flavell *et al*, 2008). During excitotoxicity, MEF2s are cleaved by caspases generating DNA binding domains without the transactivation domain, which acts as a dominant negative interfering form (Li *et al*, 2001; Okamoto *et al*, 2002). Time-course analysis of protein extracts of cortical neurons exposed to NMDA, subjected to OGD or brains from rats that have been subjected to ischemia, showed a calcium-dependent reduction of MEF2A in a pattern that correlated well with Mfn2 expression (Fig 7A and B, and Supplementary Fig S7B and C). This raises the possibility that NMDA-dependent cleavage of MEF2s may be responsible for Mfn2 downregulation in excitotoxicity. Neurons expressing the DNA binding domain of MEF2 without the transactivation domain (MEF2-DN) showed reduced expression of Mfn2 protein and mRNA (Fig 7C). Consistent with the reduced expression of Mfn2, MEF2-DN transduced neurons contained fragmented mitochondria whose morphology was restored by expressing exogenous Mfn2 (Fig 7D and E). Mitochondria of MEF2-DN expressing neurons showed reduced mitochondrial membrane potential that could be raised by overexpression of Mfn2 (Fig 7F). MEF2-DN expression caused neuronal death when doses of NMDA at the threshold of toxicity (15  $\mu$ M) were applied, but co-expression of Mfn2 completely blocked neuronal death (Fig 7G and H). All these results demonstrate that Mfn2 expression is regulated by MEF2 but do not answer the question of whether MEF2 degradation is the main factor mediating Mfn2 downregulation in excitotoxicity. Thus, we analyzed the levels of Mfn2 mRNA in neurons transduced with AAV coding MEF2-DN and observed that Mfn2 downregulation with respect to its control (GFP transduced) neurons was not additively enhanced when NMDA was applied, suggesting that they act in a common pathway (Fig 7C; note that the AAV transduction efficiency was around 75–90%, thus the results underestimate the



**Figure 6. Mfn2 is regulated at transcriptional level in excitotoxicity.**

A, B Cortical neurons with or without pre-incubation with proteasome inhibitor MG-132 (10  $\mu$ M) were treated for 4 h with NMDA (30  $\mu$ M), and Mfn2 levels were analyzed by Western blot. Densitometric analysis is shown in (B) ( $n = 7$ ). Results are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

C–E Cortical neurons were treated with NMDA (30  $\mu$ M) for the indicated times, and mRNA expression was determined by real-time qPCR ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ , two-tailed  $t$ -test. Cortical neurons were treated with transcriptional inhibitor actinomycin D, translational inhibitor cycloheximide, and NMDA (30  $\mu$ M) for 4 h as indicated, and Mfn2 protein expression was analyzed by Western blot. Representative Western blot and densitometric analysis are shown in (D) and (E), respectively ( $n = 4$ ). Results are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , two-tailed  $t$ -test.

Source data are available online for this figure.

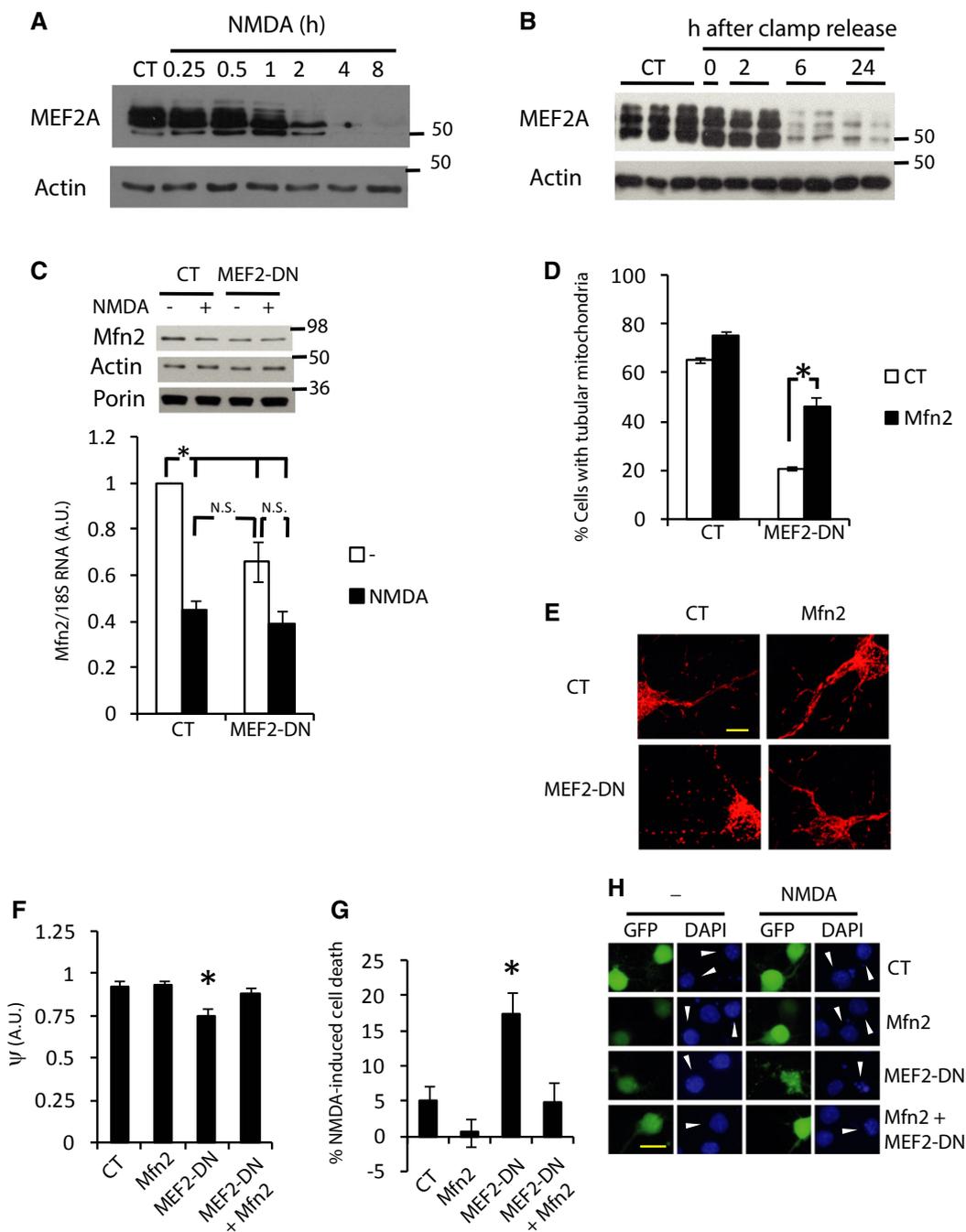
actual MEF2-DN-dependent repression). Together, these data demonstrate a crucial role of MEF2 in the excitotoxicity-dependent downregulation of Mfn2.

#### MEF2A directly regulates basal Mfn2 expression in neurons

Next, we investigated whether MEF2 could directly regulate Mfn2 expression. In promoter reporter assays, MEF2-DN repressed the activity of human Mfn2 promoter in neurons but did not repress the activity of SESN2 promoter, consistent with the unchanged expression of SESN2 in excitotoxicity (Fig 8A). The effect of MEF2-DN on the Mfn2 promoter was neuron specific since it did not affect the promoter activity in 10T1/2 fibroblasts, a cell line with far

less expression of MEF2A than neurons (Fig 8A and Supplementary Fig S8A). These results are consistent with a prevalent role of MEF2 in the regulation of basal Mfn2 expression in neurons.

Next, we determined the *cis*-elements involved in the effects of MEF2A on the transcriptional activity of the Mfn2 promoter. In agreement with the low expression of MEF2A in 10T1/2 cells, over-expression of MEF2A strongly activated the Mfn2 promoter (Fig 8B). Deletion analysis of the Mfn2 promoter identified the MEF2A activated region as being between  $-1,332$  and  $-668$  relative to the transcription start site (Fig 8B). The MEF2 transcription factors bind DNA in A/T rich sequences (Black & Olson, 1998). The sequence  $-1,332/-862$  contains two putative MEF2 binding sites (Supplementary Fig S8B). In order to show the functional role of



**Figure 7. Excitotoxicity-mediated Mfn2 downregulation depends on MEF2.**

A, B Time course of excitotoxicity-dependent MEF2A degradation in (A) cortical neurons *in vitro* treated with NMDA (30  $\mu$ M) for 4 h and (B) brain extracts of rats subjected to MCAO plus 90 min of ipsilateral common carotid artery clamp followed by clamp release for the indicated times.

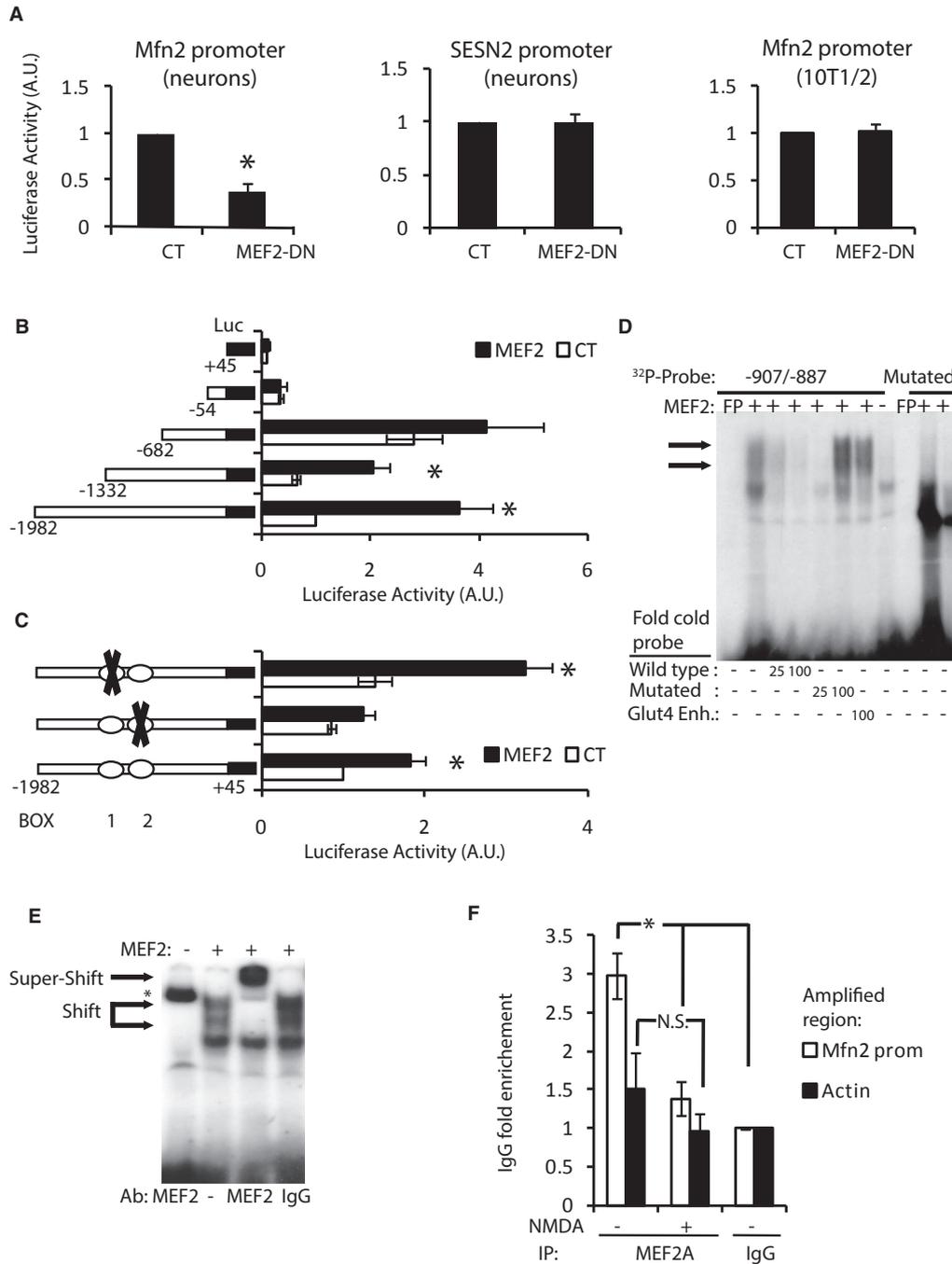
C Cortical neurons transfected with AAV expressing MEF2-DN or GFP (control) were treated with NMDA (30  $\mu$ M) for 4 h and Mfn2 mRNA and protein expression was determined ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

D, E Mitochondrial morphology in cortical neurons transfected with the indicated expression vectors (D) ( $n = 4-5$ ). \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Representative images are shown in (E).

F Mitochondrial membrane potential of neurons expressing the indicated vectors relative to surrounding untransfected neurons ( $n = 9-10$  cells from three independent experiments). \* $P < 0.05$ , two-tailed *t*-test.

G, H Cortical neurons were transfected with the indicated expression vectors. After 48 h, cells were treated with subtoxic doses of NMDA (15  $\mu$ M) for 6 h and cell death was analyzed ( $n = 8$ ). \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Representative images are shown in (H). Arrowhead points to the transfected neuron. Scale bar, 20  $\mu$ m.

Data information: Results are presented as mean  $\pm$  SEM.  
Source data are available online for this figure.



**Figure 8. MEF2A directly regulates basal Mfn2 expression in neurons.**

**A** Luciferase-based reporter of *Mfn2* promoter in cortical neurons (left) or 10T1/2 cell line (right) and SESN2 promoter in cortical neurons (center) in control or MEF2-DN-overexpressing cells ( $n = 3-9$ ). \* $P < 0.05$  compared to control, two-tailed  $t$ -test.

**B** Deletion analysis of a luciferase-based reporter of the *Mfn2* promoter in 10T1/2 cells co-expressed with control or MEF2 plasmids ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , two-tailed  $t$ -test.

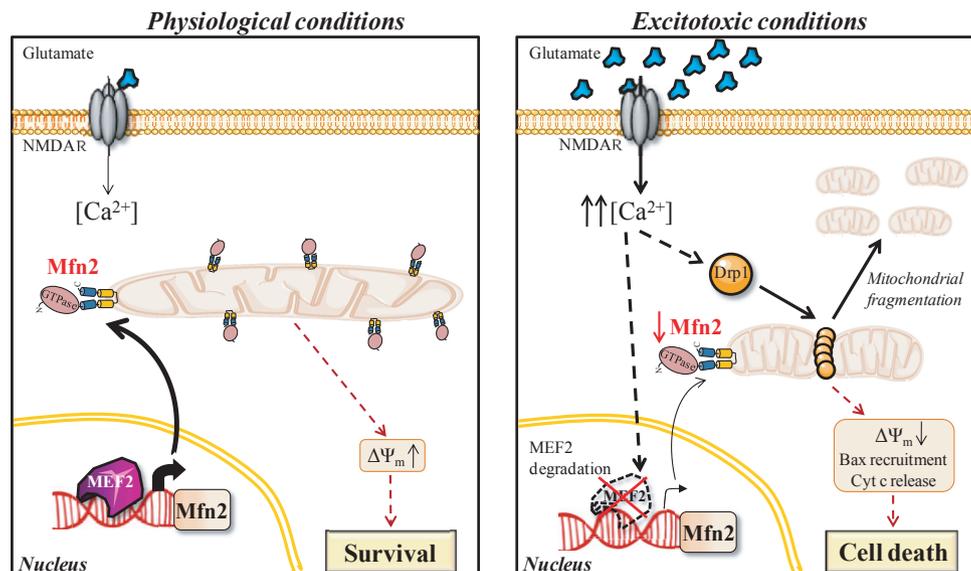
**C** Effect of putative MEF2 binding site mutations on MEF2-dependent induction of the *Mfn2* promoter in 10T1/2 cells ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  compared to control, two-tailed  $t$ -test.

**D** EMSA performed with nuclear extracts of HeLa cells overexpressing MEF2 and radiolabeled probe encoding BOX 2 from *Mfn2* promoter. Retardation complexes are indicated with arrows. Excess of cold oligonucleotide, mutated oligonucleotide or oligonucleotide of the *Glut4* gene that contains a MEF2 binding site was used to compete. Radiolabeled probe containing mutated BOX 2 did not produce retardation complexes.

**E** Supershift was performed using anti-MEF2 polyclonal antibody. Pre-immune serum was used as a negative control. \* indicates non-specific binding of the probe to anti-MEF2 antibody.

**F** ChIP on cortical neurons untreated or treated with NMDA (30  $\mu$ M) for 4 h using the indicated antibodies ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

Data information: Results are presented as mean  $\pm$  SEM.



**Figure 9.** Proposed model for the changes in mitochondrial morphology and vulnerability in excitotoxic conditions.

In cortical neurons under physiological conditions, MEF2 binds Mfn2 promoter and regulates its basal gene expression resulting in mainly tubular mitochondria. In excitotoxic conditions, Drp1 translocates to mitochondria and mediates rapid, reversible mitochondrial fission. An increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  produces MEF2 degradation, and Mfn2 gene expression is consequently downregulated, producing a delayed long-term effect on mitochondrial morphology. Reduced expression of Mfn2 impairs mitochondrial function, which causes dysregulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, facilitates Bax translocation to mitochondria, release of cytochrome c, and enhances delayed excitotoxic death.

these putative MEF2 binding sites, we disrupted the A/T-rich sequence, introducing C and G by directed mutagenesis (Supplementary Fig S8B). Mutation of BOX 1 did not modify the MEF2A-induced promoter activation, but mutation of BOX 2 cancelled the effect of MEF2A (Fig 8C). These results indicated that BOX 2 is the *cis*-element required for MEF2A mediated activation of the Mfn2 promoter.

Since MEF2A was able to *trans*-activated the Mfn2 promoter, EMSA experiments were performed in order to ascertain whether MEF2A was bound to BOX 2. A DNA fragment encompassing BOX 2 was radioactively labeled and incubated with nuclear extracts of HeLa cells overexpressing MEF2A. MEF2A bound BOX 2-containing probe, inducing the typical double band mobility shift (Santalucia *et al*, 2001), but did not bind the mutated probe (Fig 8D). The retarded bands were competed with a 25- or 100-fold excess of unlabeled oligonucleotide probe or 100-fold excess of a probe of the Glut4 promoter that has previously been shown to bind MEF2 (Santalucia *et al*, 2001), whereas the cold mutated probe was unable to compete with the retarded bands. In addition, an antibody against MEF2 supershifted the complex (Fig 8E).

Bioinformatic analysis of 2.5 kb of the rat Mfn2 promoter identified that there were four putative MEF2 binding sites in the region spanning  $-2,313/-1,983$  (Supplementary Fig S8C). We designed primers to amplify within this region and performed ChIP with anti-MEF2A antibody in rat cortical neurons unstimulated or stimulated with NMDA for 4 h. We found that under basal conditions, MEF2A was bound to this region, but after NMDA stimulation, there was no enrichment of this region with the chromatin immunoprecipitate (Fig 8F). These observations support the hypothesis that MEF2A regulates basal transcription of Mfn2 in neurons and as a consequence of MEF2A degradation Mfn2 transcription is downregulated in excitotoxicity (Fig 9).

## Discussion

Mitochondria are dynamic organelles that continuously fuse and divide. Changes in mitochondrial dynamics have profound effects on mitochondrial function and therefore mitochondrial viability. Here, we have studied mitochondrial dynamics in excitotoxicity. Our findings show that most of the mitochondrial fragmentation occurs within the first hour following the excitotoxic insult. This early phase depends partially on Drp1 mitochondrial translocation and lasts as long as the stimulus is present. Four hours after initiation of the insult, and regardless of its removal, delayed mitochondrial fragmentation that correlates with the reduction in Mfn2 protein levels due to its transcriptional downregulation occurs. Loss of Mfn2 impairs mitochondrial function and participates in delayed excitotoxic damage.

### Mechanisms of mitochondrial fragmentation in excitotoxicity

Drp1 is subjected to several posttranslational modifications that regulate its fission activity. Neuronal depolarization activates CaMKI, which phosphorylates Drp1 at Ser600, promoting mitochondrial fragmentation that is reversible once neurons repolarize (Han *et al*, 2008). The reversibility of Drp1-mediated mitochondrial fragmentation has also been observed in pathological conditions. Mitochondrial fragmentation induced by NO donors is a rapid and reversible process (Barsoum *et al*, 2006).  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the NMDA receptor produces NOS activation, which has been implicated in nitrosative stress and cell death (Sattler *et al*, 1999). Nitrosative stress causes S-nitrosylation of Drp1 at Cys644, which enhances mitochondrial fission (Cho *et al*, 2009). In agreement with previous reports (Barsoum *et al*, 2006), we show that NOS inhibition partially blocks NMDA-mediated mitochondrial

fragmentation. The degree of inhibition of the mitochondrial fragmentation achieved by NOS inhibitors is similar to that achieved using genetic and pharmacological inhibitors of Drp1. That suggests the involvement of a mechanism other than Drp1 in the early phase of mitochondrial fragmentation. Opa1 is cleaved in a mitochondrial membrane potential-dependent manner, promoting mitochondrial fission (Ishihara *et al*, 2006; Griparic *et al*, 2007; Song *et al*, 2007), but we were unable to detect changes in the proportion of short and long forms of Opa1 in excitotoxicity, either *in vitro* or *in vivo*. Another possibility is that excitotoxicity could promote the modification of lipids, which has been shown to affect mitochondrial dynamics (Choi *et al*, 2006). The possibility that as yet unknown posttranscriptional modifications inhibit the fusion machinery in excitotoxic conditions cannot be ruled out either.

Our data also indicate that Mfn2 intervenes in the delayed phase of mitochondrial fragmentation. Cultured rat primary cortical neurons exposed to excitotoxic doses of NMDA or subjected to OGD, and *in vivo* middle cerebral artery occlusion in rats show reduced expression of Mfn2 but no changes in Mfn1 or Opa1. During the preparation of the manuscript, two independent studies confirmed the downregulation of Mfn2 in excitotoxicity. Primary rat cortical neurons exposed to 3 h of OGD also produced a reduction in Mfn2 protein with no changes in Opa1 and an increase in Mfn1 expression (Wappler *et al*, 2013). In an *in vivo* study, a reduction in Mfn2, and also of Opa1 expression, was observed in mice subjected to MCAO (Kumari *et al*, 2012).

### Dependence of neurons on Mfn2

Mfn1 can compensate for some but not all of the functions of Mfn2. Analysis of Mfn2 and Mfn1 knockout mice indicates that they have both redundant and distinct functions (Chen *et al*, 2003, 2007). Unlike Mfn1, a lack of or defects in Mfn2 have a great impact on neuronal viability. Mfn2 mutations have been found to cause the dominantly inherited neurological disease Charcot-Marie-Tooth type 2A (CMT2A) (Zuchner *et al*, 2004). Defects in mitochondrial mobility and fusion have been proposed as the mechanism by which Mfn2 mutations cause CMT2A but this has not been fully established (Baloh *et al*, 2007). Mfn2 is required for postnatal development of the cerebellum (Chen *et al*, 2007). Conditional dopaminergic Mfn2 knockout neurons show that Mfn2, but not Mfn1, is essential for striatal projections and proper nigrostriatal circuit function (Lee *et al*, 2012; Pham *et al*, 2012).

As a consequence of excitotoxicity-mediated Ca<sup>2+</sup> overload neurons die initially by necrosis, surviving neurons can undergo delayed death in a manner dependent on the mitochondrial function (Ankarcrona *et al*, 1995; Luetjens *et al*, 2000; D'Orsi *et al*, 2012). We show here that, unlike Mfn1 expression, exogenous expression of Mfn2 protects neurons against NMDA-induced cell death. Mfn2 expression interferes with Bax recruitment to mitochondria and subsequent release of cytochrome c, as has been observed in other cell types (Sugioka *et al*, 2004; Neuspiel *et al*, 2005). The precise mechanism by which Mfn2 interferes with Bax activation is unknown. One possibility is that loss of Mfn2 facilitates OMM remodeling by Drp1 that has been shown to stimulate Bax oligomerization (Montessuit *et al*, 2010). Mfn2 interacts with different members of the Bcl-2 family, both pro- and anti-apoptotic (Suen *et al*, 2008). It

cannot be ruled out the possibility that by changing Mfn2 levels, it affects the equilibrium of interactions between pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins to favor Bax assembly and MOMP formation.

The relation between autophagy and cell death is controversial (Baehrecke, 2005; Galluzzi *et al*, 2012). Although in most known cases, autophagy constitutes a cytoprotective response activated by dying cells in an attempt to cope with stress (Galluzzi *et al*, 2012), cell death with and by autophagy has been reported in focal cerebral ischemia (Puyal *et al*, 2009, 2013). Mfn2 KO fibroblasts show reduced autophagy in response to ER stress (Muñoz *et al*, 2013). Interestingly, it has been reported that phosphorylated Mfn2 by PINK1 acts as a receptor for Parkin (Chen & Dorn, 2013), which is recruited to damaged mitochondria to promote mitophagy (Narendra *et al*, 2008; Chen & Dorn, 2013). How the reduction of Mfn2 in excitotoxicity affects mitophagy and autophagy-mediated cell death awaits further investigations.

### Mfn2 is transcriptionally downregulated in excitotoxicity

During recent years, several groups have established the role of the ubiquitin/proteasomal system in stress-mediated Mfn2 degradation. Mitochondrial depolarization promotes Mfn2 ubiquitinylation and proteasomal degradation in a Parkin-dependent manner (Tanaka *et al*, 2010; Chan *et al*, 2011). In stress conditions, JNK phosphorylates Mfn2 at Ser 27, which recruits the E3 ubiquitinating ligase Huwe 1, leading to its ubiquitination and degradation (Leboucher *et al*, 2012). Although excitotoxicity causes both mitochondrial depolarization and JNK activation (Borsello *et al*, 2003; Soriano *et al*, 2006b, 2008; Nicholls, 2009), the reduction in Mfn2 protein levels was not blocked by inhibiting the proteasome. We found that the main mechanism implicated in Mfn2 reduction acts at the transcriptional level and does not seem to depend on enhanced proteolysis since inhibiting transcription or translation does not further reduce Mfn2 levels. Interestingly, microarray analysis has showed more than 50% reduction in Mfn2 mRNA in the penumbra of rats subjected to MCAO (Ramos-Cejudo *et al*, 2012). We have shown that transcription factor MEF2 regulates basal Mfn2 transcription in neurons and that excitotoxicity-mediated MEF2 degradation (Li *et al*, 2001; Okamoto *et al*, 2002) results in transcriptional downregulation of Mfn2 (Fig 9). MEF2 transcription factors play a pivotal role in brain development, synapse development, and neuronal survival. The genetic program regulated by MEF2 that controls synaptic remodeling has been characterized (Flavell *et al*, 2008), but although many studies have pointed to the importance of MEF2 in supporting neuronal viability (Mao *et al*, 1999; Li *et al*, 2001; Okamoto *et al*, 2002), the precise target genes are poorly defined. Here, we demonstrate that Mfn2 is a novel MEF2 target gene that can mediate its pro-survival function.

### Mitochondrial dynamics in neurodegeneration

Mitochondrial dysfunction and excitotoxicity are common features of adult-onset neurodegenerative disorders such as Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases, some of them occurring primarily in the absence of genetic linkage. Alterations in mitochondrial dynamics have been reported in all these diseases (Itoh *et al*, 2013). Mfn2 is dynamically regulated; thus, its misregulation could intervene in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. Further studies are required to clarify the role of Mfn2 in the

progression of chronic late-onset neurodegenerative disorders. In this study, we have shown that neurons with reduced Mfn2 have dysfunctional mitochondria, altered  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis that could sensitize neurons to additional insults. In our excitotoxicity model, Mfn2 expression protects against delayed excitotoxic cell death by interfering with Bax recruitment to mitochondria. This suggests that Mfn2 downregulation could determine the fate of neurons in the penumbra area, the most clinically relevant therapeutic target against ischemic stroke (Lo, 2008).

Thereby, Mfn2 is a potential therapeutic target against excitotoxicity in acute episodes and chronic neurodegenerative diseases.

## Materials and Methods

### Cell culture, transfection, and determination of cell death

Cortical neurons from E21 Sprague–Dawley rats were cultured as described previously (Soriano *et al*, 2008). Experiments were performed after a culturing period of 10–11 days during which cortical neurons develop a rich network of processes, express functional NMDA-type and AMPA/kainate-type glutamate receptors, and form synaptic contacts. Prior to stimulations and transfections, neurons were transferred from growth medium to TMO medium containing 10% MEM (Invitrogen), 90% salt-glucose-glycine (SGG) medium (SGG: 114 mM NaCl, 0.219%  $\text{NaHCO}_3$ , 5.292 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES, 1 mM glycine, 30 mM glucose, 0.5 mM sodium pyruvate, 0.1% phenol red; osmolarity 325 mosm/l). Transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). For cell death determination, neurons transfected with GFP plus the indicated expression vectors were treated with NMDA for 6 h and fixed. At this time point, damaged neurons show pyknotic nuclei, but GFP signal has not been lost yet. Nuclei were stained with DAPI, and cell death was determined by counting the number of DAPI-stained pyknotic nuclei as a percentage of the total transfected neurons. NMDA-dependent cell death was calculated subtracting basal cell death to the cell death after NMDA treatment.

10T1/2 and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum in subconfluent cultures.

Transfections were performed with either Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or Fugene (Roche). For Bax knockdown experiments, 25 ng of Rat Bax (24887) siRNA-SMART pool (Thermo Scientific) containing a pool of 4 siRNAs targeting rat Bax were transfected.

### Focal ischemia model

All animal procedures were authorized by the veterinary office of the Canton of Vaud and were in accordance with the directives of the Swiss Academy of Medical Science. After anesthesia (2.5% isoflurane), middle cerebral artery (MCA) occlusion was performed in 12-day-old (P12) male Sprague–Dawley rats as previously described (Vaslin *et al*, 2009). Briefly, first, the main (cortical) branch of the left MCA was electrocoagulated just below its bifurcation into the parietal and frontal branches. Then, the left common carotid artery was transiently occluded with a clamp for 90 min. Rat pups were maintained at 37°C in the induction chamber (2.5% isoflurane) while the left common carotid artery was clamped. The

arterial clamp was then removed, and the rat pups were transferred back to their mother until sacrifice.

Rat pups were decapitated, and the brains were removed in PBS containing 1 mmol/l  $\text{MgCl}_2$  on ice. The cortex was dissected and collected in protein hypotonic lysis buffer [20 mmol/l HEPES, pH 7.4, 10 mmol/l NaCl, 3 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 2.5 mmol/l EGTA, 0.1 mmol/l dithiothreitol, 50 mmol/l NaF, 1 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% Triton X-100, and a protease inhibitor cocktail (Roche)]. Tissues were homogenized and sonicated, and protein concentration was determined using the Bradford assay.

### Oxygen and glucose deprivation

Neurons were transferred from TMO, washed once in a glucose-free, balanced salt solution (SGG): 114 mM NaCl, 0.219%  $\text{NaHCO}_3$ , 5.292 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES, 1 mM glycine, 0.5 mM sodium pyruvate, 0.1% phenol red; which had previously been degassed by flushing the solution with 95%  $\text{N}_2$ /5%  $\text{CO}_2$  for 5 min. Cells were placed in degassed glucose-free SGG and put in a modular incubator chamber, which was flushed with 95%  $\text{N}_2$ /5%  $\text{CO}_2$  for 4 min at a flow rate of 20 l/min, according to manufacturer's instructions (Stemcell Technologies, Grenoble, France), in order to fully expel any remaining oxygen within the chamber. The chambered cells were then left in OGD at 37°C for 1 h, before being returned to normoxic conditions and glucose-containing media (TMO). No OGD control cells were placed in SGG and maintained in normoxic conditions for 1 h before also being returned to TMO. All cells were left in TMO until protein and RNA isolation for the time point indicated.

### Plasmids and virus generation

The following plasmids have been described previously: the –1,982/+45 Mfn2-Luciferase vector and its 5' deletion constructs (Soriano *et al*, 2012), SESN2-Luc (Papadia *et al*, 2008), and mtRFP (Legros *et al*, 2002). HA-Mfn2 was subcloned into the pEF vector at the BamHI/XbaI sites. The MEF2A expression vector was a gift from Pilar Ruiz-Lozano (Stanford University, USA), GFP-Drp1 was a gift from AM van der Bliek (UCLA, USA), Drp1-K38A-myc was Addgene plasmid 26049, deposited by Dr. Chan, and Mfn2-myc was Addgene plasmid 23213, deposited by Dr. Chan (Chen *et al*, 2003).

The vectors used to construct and package recombinant adeno-associated viruses (rAAVs) were provided by Dr. Bading [U. Heidelberg, Germany (Zhang *et al*, 2007)]. For construction of pAAV-MEF2-DN, the first 252 bp of the mouse MEF2D cDNA (a gift from E. Olson; U. Texas South Western, USA) were amplified using the primers: forward 5'- ATA GGA TCC ATG GGG CGA AAG AAG ATA CAA ATC ACA CGC ATA ATG GAT G -3' and reverse 5'- ATA AAG CTT TCA CAG ATC TTC TTC AGA AAT AAG TTT TTG TTA GGA GGG CCT CGT TTG AAA ATA AAA TC -3'. The amplified product contains sequences that produce BamHI and HindIII restriction sites at the 5' and 3', respectively (italics) and also for inserting a myc tag into the C terminus (bold). GFP in the rAAV-GFP vector was removed by BamHI/HindIII digestion, and the MEF2-DN PCR product was cloned into the rAAV vector to express the first 84 amino acids of the N-terminus of MEF2, which contains the DNA binding domain but not the transactivation domain. rAAV for

shRNA expression contains the U6 promoter for shRNA expression and a CMV/chicken beta-actin hybrid promoter driving hrGFP expression. rAAV-shRNA targeting Mfn2 were made by swapping the sh-sc sequence of rAAV-sh-sc (gift from H. Bading) for the following sequences of the rat Mfn2 into the BamHI and HindIII sites: shMfn2: 5'- AGA GGG CCT TCA AGC GCC AGT-3', shMfn2.2: 5'- GGG AAG AGC ACC GTG ATC AAT-3', shMfn2.3: 5'- TCC TCA AGG TTT ATA AGA ATG-3'. All newly generated constructs were confirmed by sequencing.

Neurons were infected with rAAV at DIV4. Infection efficiencies were determined at DIV 10–11 by analyzing GFP fluorescence or immunocytochemical analysis; they ranged from 80 to 90% of the viable neurons.

### Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis was performed using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The mutated sequences are shown in Supplementary Fig S8B.

### Luciferase assay

Firefly luciferase-based reporter gene was transfected along with a Renilla expression vector (pTK-RL; Promega), and also, where relevant, MEF2-DN expression vector. Forty hours after transfection luciferase assays were performed using the Dual Glo assay kit (Promega) with Firefly luciferase-based reporter gene activity normalized to the Renilla control (pTK-RL plasmid) in all cases.

### RNA isolation, RT-PCR, and qPCR

RNA was isolated using an RNA extraction kit (Life Technologies). For qPCR, cDNA was synthesized from RNA using the SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. qPCR was performed in a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystem) using GoTaq QPCR Master Mix (Promega) according to the manufacturer's instructions. The primers used were Mfn2 -F: 5'- ATG TCA AAG GGT ACC TGT CCA-3', -R: 5'- CAA TCC CAG ATG GCA GAA CTT-3'; SESN2 -F: 5'- GGA TTA TAC CTG GGA AGA CC -3, -R: 5'- CGC AGT GGA TGT AGT TCC -3'; Mfn1 -F: 5'-CAA ACT GCA GCC ACC AAG T-3', -R: 5'-GTT GGC ACA GTC GAG CAA-3'; 18S -F: 5'-GTG GAG CGA TTT GTC TGG TT-3', -R: 5'-CAA GCT TAT GAC CCG CAC TT-3'. Expression of the gene of interest was normalized to 18S, a commonly used control.

### Western blotting and antibodies

Total cell lysates were boiled at 100°C for 5 min in 1.5× sample buffer (1.5 M Tris pH 6.8; glycerol 15%; SDS 3%; β-mercaptoethanol 7.5%; bromophenol blue 0.0375%). Gel electrophoresis was performed using 9% polyacrylamide gels. The gels were blotted onto PVDF membranes, which were then blocked for 1 h at room temperature with 5% (w/v) non-fat dried milk in PBS with 0.1% Tween 20. The membranes were then incubated at 4°C overnight with the primary antibodies diluted in blocking solution: anti-Mfn2 (1:2,000; Abcam), Mfn1 (1:250, Santa Cruz), Opa1 (1:1,000; BD

Biosciences), Drp1 (1:1,000, BD Biosciences), MEF2A (1:750, Santa Cruz), Jun (1:1,000, BD Biosciences), Actin (1:10,000, Sigma), and Porin (1:100,000, Abcam). For visualization of Western blots, HRP-based secondary antibodies were used followed by chemiluminescent detection on Kodak X-Omat film. Western blots were analyzed by digitally scanning the blots, followed by densitometric analysis (ImageJ). All analyses involved normalizing to a loading control, actin and porin.

### Imaging studies

Cells were visualized using a TCS SP2 Leica confocal laser scanning microscope (Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Germany) adapted to an inverted Leitz DMIRBE microscope at 37°C in a controlled 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (Life Imaging Services). Pictures were acquired using a 63× (1.32 NA) Leitz Plan-Apochromatic objective. Images were analyzed using ImageJ software (Abramoff et al, 2004).

To quantify mitochondrial membrane, potential neurons were loaded with 20 nM tetramethylrhodamine methylester (TMRM; Sigma) in SGG medium without phenol red. Transfected cells were identified by co-transfecting GFP expression plasmid.

Single cells were monitored, TMRM was excited at 540 nm, and emission was measured using a 570-nm filter. The mitochondrial membrane potential was compared to that observed in surrounding untransfected neurons and subsequently expressed as a percentage of that observed in untransfected cells before NMDA stimulation.

For mitochondrial Ca<sup>2+</sup> analysis, neurons were loaded with 5 μM Rhod-2 (Life Technologies) for 30 min at 4°C followed for extensive washout of the dye and incubation for 20 additional minutes with SGG without phenol red at 37°C. Single cells were monitored. Rhod-2 was excited at 540 nm, and emission was measured using a 570-nm filter.

Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> was monitored with Fluo-4 (Life Technologies). Neurons were loaded 5 μM Fluo-4 for 30 min at 37°C, after 2 washes with PBS were incubated for additional 15 min and excited at 488 nm and emission captured with a 516-nm filter.

For mitochondrial morphology analysis, neurons were transfected with mitochondrially targeted RFP. After treatment, neurons were fixed, and nuclei were stained with DAPI. The number of live neurons with tubular or fragmented mitochondria was counted.

Drp1 or Bax localization was determined by transfecting cortical neurons with GFP-Drp1 or Bax-GFP, respectively, and mRFP. Forty-eight hours after transfection neurons were treated when appropriate with 30 μM NMDA and fixed.

For cytochrome c immunofluorescence, neurons were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized, blocked, and incubated overnight at 4°C with anti-cytochrome c antibody (Millipore). Antibody binding was visualized using biotinylated secondary antibody/Cy3-conjugated streptavidin.

### Measurement of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> with Indo-1

AAV-sh-sc- or AAV-sh-Mfn2-transduced neurons were loaded with 5 μM of the ratiometric Ca<sup>2+</sup> indicator Indo-1 for 30 min at 37°C in SGG medium without phenol red. After two washes with PBS,

neurons were incubated for 15 additional minutes in order to allow de-esterification of Indo-1. Measurements were made on Infinite M200PRO (TECAN). Neurons were excited at 350 nm, and the ratio of the emitted fluorescence values at 405 (Indo-1 Ca<sup>2+</sup> bound) and 485 nm (Indo-1 Ca<sup>2+</sup> free) was used as an index of [Ca<sup>2+</sup>].

#### ATP measurements

Thirty minutes before NMDA addition, neurons were incubated with medium without glucose and with pyruvate. After 30 min of NMDA treatment (15 μM), ATP was measured using the ATPlite Luminescence Assay System (Perkin-Elmer) on Infinite M200PRO (TECAN).

#### NAD<sup>+</sup>/NADH measurements

NAD<sup>+</sup> and NADH levels were measured individually taking advantage of the different stabilities of the different forms in acidic or basic buffer. We employed NAD<sup>+</sup>/NADH-Glo assay (Promega) following manufacturer's instructions.

#### Oxygen consumption measurements

Cortical neurons were plated in Seahorse Bioscience XF24 plates and transduced with AAV producing shRNA-scr or shRNA-Mfn2. Seahorse Bioscience XF24 extracellular flux analyzer was used to measure oxygen consumption in these cells. The instrument was calibrated the day before the experiment, following the manufacturer's instructions. On the day of the experiment, the injection ports on the sensor cartridge were loaded with 1.25 μM oligomycin (oli; complex V inhibitor) to distinguish the percentage of oxygen consumption devoted to ATP synthesis and the percentage of oxygen consumption needed to overcome the natural proton leak across the inner mitochondrial membrane, 3 μM FCCP to calculate the 'spare' respiratory capacity of cells, 1 μM rotenone (complex I inhibitor) and 1 μM antimycin A (complex III inhibitor) to calculate the remaining respiration due to residual oxygen consumption (rox). During the sensor calibration, neurons remained in a 37 °C incubator without CO<sub>2</sub> in 700 μl of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) assay medium (120 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM glucose, 1.0 mM pyruvate, and 4 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin, pH 7.2.). Plates were immediately placed into the calibrated Seahorse XF24 flux analyzer for mitochondrial bioenergetic analysis. OCR was normalized for total protein/well and calculated as OCR-OCR<sub>rox</sub> to subtract non-mitochondrial respiration. Spare respiratory capacity was calculated as OCR<sub>CCCP</sub>/OCR<sub>roxi</sub>. Respiratory control ratio was calculated as OCR<sub>CCCP</sub>/OCR<sub>oli</sub>.

#### Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Two 35-mm dishes were used for each treatment (approximately 4.5 × 10<sup>6</sup> cells). Medium was removed, and treated cells were washed with pre-warmed medium and incubated for 10 min at room temperature with 1% para-formaldehyde in pre-warmed medium, to crosslink proteins to DNA. The reaction was stopped by adding glycine to a final concentration of 125 mM for 5 min. Cells were washed twice with ice-cold PBS and harvested on ice in swelling buffer [25% HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.1%

NP-40 plus protease inhibitor cocktail set III (Calbiochem)]. Nuclei were isolated using a douncer and centrifuging at 1,500 g for 5 min. Nuclei were resuspended in 200 μl sonication buffer (50 mM HEPES pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 0.1% SDS plus protease inhibitors). The nuclei were sonicated using a Diagenode Bioruptor (Liege, full power 30 s on, 30 s off, in an ice bath for 20 min) to produce fragments < 500 bp. Sonicated chromatin was pre-cleared with protein-A agarose beads/salmon sperm DNA for 1 h at 4°C with agitation, beads were collected by centrifugation, and supernatants were collected and subjected to immunoprecipitation. Eight micrograms of anti-MEF2A (Santa Cruz) or anti-rabbit IgG (control, Sigma) was added for overnight incubation at 4°C with agitation. After chromatin immunoprecipitation, DNA was purified using Qiagen DNA purification columns. Input (1% of total immunoprecipitated) and immunoprecipitated DNA were subjected to qPCR analysis with primers amplifying the Mfn2 promoter (-2,204/-2,136 of the rat Mfn2 promoter) 5'-TGG AGA TGG AAT TCA AGT TGG-3' forward and 5'-TGGTCACAAAATGGCTCAGT-3' reverse. As negative controls, we used primers for amplification of the actin gene 5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3' forward and 5'-CTC TCA GCT GTG GTG AA-3' reverse.

#### Electrophoretic mobility shift assays

HeLa cells were transfected with expression vector for MEF2A and 48 h later, nuclear extracts were prepared as described previously (Santalucia *et al*, 2001). Radiolabeled double-strand oligonucleotide probe containing the human Mfn2 promoter sequence (containing the MEF2 binding site: 5'-ATT TTT GTA TTT TTA GTA CAG-3' (MEF2wt), the mutated MEF2 binding site (in bold), which differs from the wild type in the same three nucleotides used in the luciferase assay: 5'-ATT TTT GGA TCC TTA GTA CAG-3' (MEF2mut), and the MEF2 binding site in the Glut4 promoter: 5'-CGT GGG AGC TAA AAA TAG CCA-3' (MEF2Glut4) was incubated with 10 μg nuclear extract in a final volume of 20 μl and electrophoresis was performed as described previously (Santalucia *et al*, 2001). Dried gel was exposed to Kodak film. Competitor mutated oligonucleotide differed from wild-type EMSA sequence by the same base substitution used in the functional experiments. For supershift assays, MEF2 antibody was added to the corresponding binding reactions after incubation with the radiolabeled probe and incubated for a further 10 min at room temperature before loading onto gels.

#### Statistical analysis

Statistical testing involved two-tailed Student's *t*-tests. For any multiple comparisons within data sets, we used a one-way ANOVA followed by the Bonferroni's *post hoc* test. All data are presented as mean ± SEM of at least three independent experiments (*n*).

**Supplementary information** for this article is available online: <http://emboj.embopress.org>

#### Acknowledgements

We thank G.E. Hardingham for critically reading the manuscript. This work was supported by the Fundació La Marató de TV3 (111210; FXS) and Spanish

Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2011-30283; FXS). FXS is a researcher from the Programa Ramón y Cajal funded by the Ministerio de Ciencia e Innovación (RYC-2009-05407).

### Author contributions

AM-R designed and performed most of the experiments and analyzed data; MS-M, JPM, VG, JO, and JP-C designed and performed experiments and analyzed data; MP and MR analyzed data; JP and AZ designed experiments, analyzed data, and had critical input into the manuscript preparation; FXS conceived, designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int* 11: 36–42
- Almeida A, Bolanos JP, Medina JM (1999) Nitric oxide mediates glutamate-induced mitochondrial depolarization in rat cortical neurons. *Brain Res* 816: 580–586
- Ankarcrona M, Dybukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961–973
- Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34: 325–337
- Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacín M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. *J Biol Chem* 278: 17190–17197
- Baehrecke EH (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 505–510
- Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J (2007) Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of charcot-marie-tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 27: 422–430
- Barsoum MJ, Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Kushnareva Y, Graber S, Kovacs I, Lee WD, Waggoner J, Cui J, White AD, Bossy B, Martinou J-C, Youle RJ, Lipton SA, Ellisman MH, Perkins GA, Bossy-Wetzler E (2006) Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J* 25: 3900–3911
- Black BL, Olson EN (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 167–196
- Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* 9: 1180–1186
- Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC (2003) Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 160: 1115–1127
- Brennan AM, Won Suh S, Joon Won S, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson RA (2009) NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 12: 857–863
- de Brito OM, Scorrano L (2008a) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605–610
- de Brito OM, Scorrano L (2008b) Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. *Antioxid Redox Signal* 10: 621–634
- Brooks C, Wei Q, Feng L, Dong G, Tao Y, Mei L, Xie Z-J, Dong Z (2007) Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 11649–11654
- Camacho A, Massieu L (2006) Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37: 11–18
- Cereghetti GM, Stangherlin A, de Brito OM, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, Scorrano L (2008) Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15803–15808
- Chan NC, Salazar AM, Pham AH, Sweredoski MJ, Kolawa NJ, Graham RLJ, Hess S, Chan DC (2011) Broad activation of the ubiquitin–proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* 20: 1726–1737
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160: 189–200
- Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130: 548–562
- Chen Y, Dorn GW (2013) PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 340: 471–475
- Cho D-H, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA (2009) S-Nitrosylation of Drp1 mediates  $\beta$ -amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324: 102–105
- Cho D-H, Nakamura T, Lipton S (2010) Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci* 67: 3435–3447
- Choi SY, Huang P, Jenkins GM, Chan DC, Schiller J, Frohman MA (2006) A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* 8: 1255–1262
- Cook DJ, Teves L, Tymianski M (2012) Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. *Nature* 483: 213–217
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391–397
- D'Orsi B, Bonner H, Tuffey LP, Düsselmann H, Woods I, Courtney MJ, Ward MW, Prehn JHM (2012) Calpains are downstream effectors of bax-dependent excitotoxic apoptosis. *J Neurosci* 32: 1847–1858
- Flavell SW, Kim TK, Gray JM, Harmin DA, Hemberg M, Hong EJ, Markenscoff-Papadimitriou E, Bear DM, Greenberg ME (2008) Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron* 60: 1022–1038
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1: 515–525
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W et al (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death Differ* 19: 107–120
- Gandre-Babbe S, van der Blik AM (2008) The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 19: 2402–2412

- Griparic L, Kanazawa T, van der Bliek AM (2007) Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* 178: 757–764
- Han X-J, Lu Y-F, Li S-A, Kaitsuka T, Sato Y, Tomizawa K, Nairn AC, Takei K, Matsui H, Matsushita M (2008) CaM kinase  $\alpha$ -induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 182: 573–585
- Holmstrom KM, Finkel T (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 411–421
- Ikonomidou C, Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1: 383–386
- Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K (2006) Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 25: 2966–2977
- Itoh K, Nakamura K, Iijima M, Sasaki H (2013) Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends Cell Biol* 23: 64–71
- James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou J-C (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278: 36373–36379
- Karbowski M, Lee Y-J, Gaume B, Jeong S-Y, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ (2002) Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159: 931–938
- Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong S-Y, Youle RJ (2006) Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443: 658–662
- Kumari S, Anderson L, Farmer S, Mehta SL, Li PA (2012) Hyperglycemia alters mitochondrial fission and fusion proteins in mice subjected to cerebral ischemia and reperfusion. *Transl Stroke Res* 3: 296–304
- Leboucher GP, Tsai YC, Yang M, Shaw KC, Zhou M, Veenstra TD, Glickman MH, Weissman AM (2012) Stress-induced phosphorylation and proteasomal degradation of mitofusin 2 facilitates mitochondrial fragmentation and apoptosis. *Mol Cell* 47: 547–557
- Lee S, Sterky FH, Mourier A, Terzioglu M, Cullheim S, Olson L, Larsson N-G (2012) Mitofusin 2 is necessary for striatal axonal projections of midbrain dopamine neurons. *Hum Mol Genet* 21: 4827–4835
- Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the Inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13: 4343–4354
- Li M, Linseman DA, Allen MP, Meintzer MK, Wang X, Laessig T, Wierman ME, Heidenreich KA (2001) Myocyte enhancer factor 2A and 2D undergo phosphorylation and caspase-mediated degradation during apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 21: 6544–6552
- Liesa M, Palacín M, Zorzano A (2009) Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 89: 799–845
- Lo EH (2008) A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 14: 497–500
- Luetjens CM, Bui NT, Sengpiel B, Münstermann G, Poppe M, Krohn AJ, Bauerbach E, Krieglstein J, Prehn JHM (2000) Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J Neurosci* 20: 5715–5723
- Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME (1999) Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 286: 785–790
- Misko AL, Sasaki Y, Tuck E, Milbrandt J, Baloh RH (2012) Mitofusin2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. *J Neurosci* 32: 4145–4155
- Montessuit S, Somasekharan SP, Terrones O, Lucken-Ardjomande S, Herzig S, Schwarzenbacher R, Manstein DJ, Bossy-Wetzel E, Basañez G, Meda P, Martinou J-C (2010) Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates bax oligomerization. *Cell* 142: 889–901
- Muir KW (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 6: 53–60
- Muñoz JP, Ivanova S, Sánchez-Wandelmer J, Martínez-Cristóbal P, Noguera E, Sancho A, Díaz-Ramos A, Hernández-Alvarez MI, Sebastián D, Mauvezin C, Palacín M, Zorzano A (2013) Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *EMBO J* 32: 2348–2361
- Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183: 795–803
- Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, McBride H (2005) Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem* 280: 25060–25070
- Nicholls DG (2009) Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1416–1424
- Oettinghaus B, Licci M, Scorrano L, Frank S (2012) Less than perfect divorces: dysregulated mitochondrial fission and neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 123: 189–203
- Okamoto S-I, Li Z, Ju C, Schölzke MN, Mathews E, Cui J, Salvesen GS, Bossy-Wetzel E, Lipton SA (2002) Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3974–3979
- Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191: 1141–1158
- Papadia S, Soriano FX, Leveille F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Sifringer M, Fowler J, Stefovskva V, McKenzie G, Craigon M, Coriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Hardingham GE (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* 11: 476–487
- Pham AH, Meng S, Chu QN, Chan DC (2012) Loss of Mfn2 results in progressive, retrograde degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal circuit. *Hum Mol Genet* 21: 4817–4826
- Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacín M, Zorzano A (2005) the charcot–marie–tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 14: 1405–1415
- Puyal J, Vaslin A, Mottier V, Clarke PGH (2009) Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol* 66: 378–389
- Puyal J, Ginet V, Clarke PGH (2013) Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 105: 24–48
- Ramos-Cejudo J, Gutierrez-Fernandez M, Rodriguez-Frutos B, Exposito Alcaide M, Sanchez-Cabo F, Dopazo A, Diez-Tejedor E (2012) Spatial and temporal gene expression differences in core and periinfarct areas in experimental stroke: a microarray analysis. *PLoS ONE* 7: e52121
- Reynolds I, Hastings T (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci* 15: 3318–3327
- Rintoul GL, Filiano AJ, Brocard JB, Kress GJ, Reynolds IJ (2003) Glutamate decreases mitochondrial size and movement in primary forebrain neurons. *J Neurosci* 23: 7881–7888

- Santalucia T, Moreno H, Palacin M, Yacoub MH, Brand NJ, Zorzano A (2001) A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. *J Mol Biol* 314: 195–204
- Sattler R, Xiong Z, Lu W-Y, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284: 1845–1848
- Shelat PB, Plant LD, Wang JC, Lee E, Marks JD (2013) The membrane-active tri-block copolymer pluronic F-68 profoundly rescues rat hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced death through early inhibition of apoptosis. *J Neurosci* 33: 12287–12299
- Smirnova E, Shurland D-L, Ryazantsev SN, van der Blik AM (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 143: 351–358
- Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* 178: 749–755
- Sorianello E, Soriano FX, Fernández-Pascual S, Sancho A, Naon D, Vila-Caballer M, González-Navarro H, Portugal J, Andrés V, Palacín M, Zorzano A (2012) The promoter activity of human Mfn2 depends on Sp1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 94: 38–47
- Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacín M, Zorzano A (2006a) Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , estrogen-related receptor- $\alpha$ , and mitofusin 2. *Diabetes* 55: 1783–1791
- Soriano FX, Papadia S, Hofmann F, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2006b) Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *J Neurosci* 26: 4509–4518
- Soriano FX, Martel M-A, Papadia S, Vaslin A, Baxter P, Rickman C, Forder J, Tymianski M, Duncan R, Aarts M, Clarke PGH, Wyllie DJA, Hardingham GE (2008) Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NR2B PDZ ligand. *J Neurosci* 28: 10696–10710
- Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci* 1: 366–373
- Suen D-F, Norris KL, Youle RJ (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22: 1577–1590
- Sugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y (2004) Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 279: 52726–52734
- Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen D-F, Karbowski M, Youle RJ (2010) Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* 191: 1367–1380
- Vaslin A, Puyal J, Clarke PGH (2009) Excitotoxicity-induced endocytosis confers drug targeting in cerebral ischemia. *Ann Neurol* 65: 337–347
- Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X (2012) The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* 148: 228–243
- Wappler EA, Institoris A, Dutta S, Katakam PV, Busija DW (2013) Mitochondrial dynamics associated with oxygen-glucose deprivation in rat primary neuronal cultures. *PLoS ONE* 8: e63206
- Westermann B (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 872–884
- Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwartzkroin PA, Morrison RS (1998) Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J Neurosci* 18: 1363–1373
- Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23: 5409–5420
- Young KW, Piñon LGP, Bampton ETW, Nicotera P (2010) Different pathways lead to mitochondrial fragmentation during apoptotic and excitotoxic cell death in primary neurons. *J Biochem Mol Toxicol* 24: 335–341
- Yu S-W, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297: 259–263
- Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Lipton SA, Ellisman M, Perkins GA, Bossy-Wetzel E (2006) Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. *Cell Death Differ* 14: 462–471
- Zhang SJ, Steijaert MN, Lau D, Schutz G, Delucinge-Vivier C, Descombes P, Bading H (2007) Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron* 53: 549–562
- Zuchner S, Mersyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V et al (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause charcot-marie-tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36: 449–451