



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Regulación de la bioenergética mitocondrial por Mfn2 mediante los contactos RE-mitocondria y su implicación en la fisiología neuronal

Sergi Casellas Díaz

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

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

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

A fluorescence microscopy image of a neuron. The image shows a complex network of green and red signals against a black background. The green signal appears to be distributed throughout the neuron, while the red signal is more concentrated in certain areas, possibly representing mitochondria. The overall structure is highly branched and intricate.

**Regulación de la bioenergética mitocondrial por
Mfn2 mediante los contactos RE-mitocondria y su
implicación en la fisiología neuronal**

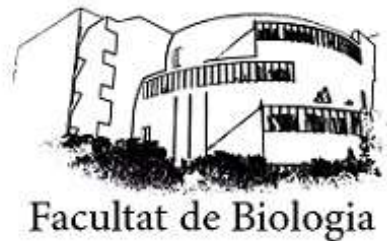
Sergi Casellas Díaz

Barcelona, Julio 2021

**Regulación de la bioenergética mitocondrial por
Mfn2 mediante los contactos RE-mitocondria y su
implicación en la fisiología neuronal**

Sergi Casellas Díaz

Barcelona, Julio 2021



Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Programa de Doctorado en Biomedicina

Memoria presentada por Sergi Casellas Díaz para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona.

La tesis doctoral titulada "*Regulación de la bioenergética mitocondrial por Mfn2 mediante los contactos RE-mitocondria y su implicación en la fisiología neuronal*" ha sido realizada en el grupo de investigación Celltec-UB, bajo la dirección y tutorización del Dr. Francesc X. Soriano Zaragoza y la co-dirección del Dr. Manuel Reina del Pozo.

El director y tutor,

A blue ink signature of Dr. Francesc X. Soriano Zaragoza.

Dr. Francesc X. Soriano Zaragoza

El co-director,

A blue ink signature of Dr. Manuel Reina del Pozo.

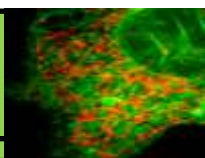
Dr. Manuel Reina del Pozo

El doctorando,

A blue ink signature of Sergi Casellas Díaz.

Sergi Casellas Díaz

RESUMEN



Las mitofusinas 1 y 2 son unas GTPasas que se encuentran en la membrana mitocondrial externa, donde llevan a cabo el proceso de fusión mitocondrial. La existencia de mutaciones en Mfn2 es la principal causa de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A, un grupo de distintas neuropatías caracterizadas por degeneración axonal. Por otro lado, otras alteraciones en Mfn2 también han sido descritas en múltiples enfermedades neurodegenerativas crónicas, en episodios traumáticos agudos como accidentes cerebrovasculares e incluso otras enfermedades no neurológicas como las cardiometabólicas. Un gran número de estudios han demostrado que Mfn2 está relacionada con la regulación del metabolismo y la bioenergética mitocondrial, ya que su supresión afecta negativamente ambos procesos y su sobreexpresión los estimula. Dado el papel del metabolismo mitocondrial en la fisiopatología de estas enfermedades, entender el mecanismo por el que Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial resulta de gran importancia.

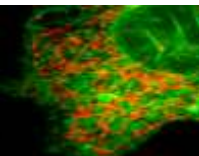
En esta tesis se demostró que la activación de la bioenergética mitocondrial por parte de Mfn2 requiere su localización en el retículo endoplasmático (RE) y es independiente a su función como proteína de fusión mitocondrial. A diferencia de Mfn1, Mfn2 se encuentra presente en el RE, concretamente en las membranas asociadas con las mitocondrias. Los contactos entre ambos orgánulos son de vital importancia en las células, ya que, entre otras funciones esenciales, crean micro-dominios que permiten la transferencia de Ca^{2+} del RE hacia las mitocondrias. Por su parte, el Ca^{2+} captado por las mitocondrias estimula diferentes enzimas del metabolismo mitocondrial y complejos encargados de mantener la bioenergética mitocondrial. En esta tesis, se observó que células carentes de Mfn2 también manifiestan defectos en la homeostasis del Ca^{2+} y en el mantenimiento de los contactos RE-mitocondrias. Mediante el uso de un enlazador artificial que mimetiza la función enlazadora de Mfn2 o diferentes formas de Mfn2 dirigidas a ambos orgánulos, se determinó que Mfn2 actúa como complejo enlazador de RE y mitocondrias, propiciando la formación de contactos óptimos para la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias. A su vez, el restablecimiento de la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias gracias a la función enlazadora de Mfn2 fue capaz de estimular la bioenergética mitocondrial, definiendo de este modo un

mecanismo por el cual Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial a través de los contactos RE-mitocondria.

La relevancia fisiológica de estos resultados se mostró en dos procesos neuronales. Por un lado, la falta de Mfn2 provocó alteraciones en el crecimiento neurítico y la formación de espinas dendríticas durante el periodo de desarrollo neuronal en modelos *in vivo* de ratón *knockout* para Mfn2. Estas alteraciones, fueron rescatadas *in vitro* mediante el enlazador artificial de RE-mitocondrias. Usando distintas formas de Mfn2 dirigidas específicamente a RE o mitocondria, se determinó que el mecanismo por el cual Mfn2 regula la bioenergética a través de los contactos RE-mitocondrias podría ser esencial durante el desarrollo neuronal para un correcto crecimiento y ramificación de sus neuritas.

Por otro lado, el restablecimiento de los contactos RE-mitocondria protegió contra la excitotoxicidad. Mfn2 destaca también por su capacidad neuroprotectora frente diferentes tipos de lesiones como daño al ADN, estrés oxidativo o privación de iones K^+ . Frente a una sobreactivación persistente de los receptores de NMDA, acontece un aumento continuo y acusado de Ca^{2+} intracelular que desencadena en muerte neuronal. Durante este proceso, los niveles de Mfn2 decrecen, hecho que correlaciona con una mayor predisposición neuronal a la apoptosis. En este estudio, se determinó que la función enlazadora de Mfn2 podría estar relacionada con el reclutamiento de Bax hacia las mitocondrias, hecho típicamente definitorio de un proceso apoptótico. De este modo, se propone este mecanismo como una potencial diana terapéutica en procesos patológicos como los accidentes cerebrovasculares isquémicos, en los cuales aparecen eventos excitotóxicos y los niveles de Mfn2 se ven reducidos.

AGRADECIMIENTOS



Cuando inicié la escritura de esta tesis, el mundo se encontraba en una situación sin precedentes, un confinamiento general a causa de una pandemia, el momento en que todo paró por completo. Me lo tomé como la situación ideal para empezar esta ardua tarea, que sabía desde el día que escogí este camino que algún día llegaría, pero que a la par veía todavía tan lejos. No quería postergarlo más, para así llegar a este momento con la tranquilidad de tener la situación bajo control. Nada más lejos de la realidad. Ahora, después de poco más de un año atípico y pasar por dos trabajosas revisiones de un mismo artículo en dos revistas científicas distintas, ha tocado correr y sufrir hasta casi el último día.

Es por eso, que me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible, de alguna forma u otra, que el lector pueda tener esta tesis entre sus manos.

En primer lugar, me gustaría dar mi más sincero agradecimiento a mi director/tutor de tesis, el Dr. Francesc X. Soriano. Él fue el primero que confió en mí cuando todavía era un estudiante de grado y me aceptó para hacer las prácticas. Desde entonces hasta ahora, he recorrido un largo camino y he crecido, no solo a nivel científico, sino personal, gracias a sus consejos, paciencia y pasión por la ciencia. Su dirección y total disponibilidad para lo que necesitara, ha hecho más amena esta complicada empresa.

En segundo lugar, y no menos importante, me gustaría agradecer enormemente al Dr. Manuel Reina, por ofrecer un ambiente de trabajo ideal y todas las facilidades posibles, no solo para la realización de esta tesis, sino para todo aquel que forma parte del grupo de investigación. Desde el primer momento siempre estuvo dispuesto a ayudar en lo que hiciera falta sin vacilar un segundo, incluso económicamente cuando esta tesis arrancaba y no aparecía la financiación necesaria.

Debo hacer una mención especial también a todos aquellos compañeros que me han acompañado durante estos años, y aunque la mayoría de ellos acabaron su estancia en el grupo de investigación, me llevo de esta experiencia su amistad. Muchas anécdotas, fotografías, cenas y fiestas dan fe de ello. Gracias a Marc, Marina, Alejo, Ana, Raquel, Rubén y Adrián por esos buenos momentos, no solo en el laboratorio, sino también fuera de él, que te hacen la vida más plena y le dan un poco de sentido.

Sin duda, debo agradecer también a Raquel, Guillem y Paula, mis compañeros actuales, por la ayuda recibida en este último tramo de la tesis. En el momento de máximo estrés, me han hecho una mano salvadora para que todo esto siguiera adelante.

No me quiero olvidar tampoco de otros miembros del grupo, como Claudia, quien desde el primer día ha tenido siempre una respuesta a cualquier duda que le he planteado y quien gracias a su organización el laboratorio no parece un corral, u Ofelia, quien siempre ha estado dispuesta a ofrecerme sus consejos frente a cualquier problema y (me) ha animado las celebraciones del grupo con sus deliciosos mojitos.

Finalmente, también me gustaría agradecer a aquellas personas que no me han brindado apoyo científico, pero sí personal, el cual es casi tan importante o incluso más.

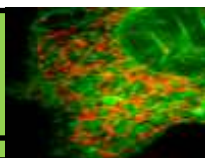
A mis amigos, quienes siempre han estado dispuestos los viernes por la noche, cerveza en mano, a hacerme olvidar esos problemas del día a día que no se quedan en el laboratorio en cuanto cierras la libreta y se empeñan en acompañarte a casa.

A mis abuelos, por mostrar siempre interés en lo que he ido haciendo durante estos años y animarme con “mis cosas del laboratorio”, es un gozo saber lo mucho que valoráis lo que he estado haciendo.

Gracias a mis padres de todo corazón, por siempre haberme mostrado su apoyo incondicional en todo aquello que he necesitado, o que incluso no sabía ni que necesitaba. Todos mis triunfos y logros tienen una parte que, indudablemente, es vuestra. Me gustaría que leyendo esta tesis os sintierais, al menos, una parte de lo orgulloso que yo me siento por vosotros.

Por último, gracias a ti, Andrea. Gracias por estar siempre dispuesta a escucharme y a animarme en momentos complicados, a aconsejarme e incitarme a seguir adelante, a entenderme y valorar mis sacrificios. Sé que tus esfuerzos por labrarte un buen futuro, están siendo incluso mayores que los míos, así que espero que dentro de unos años leamos esto y pensemos que valieron la pena. Esta tesis va dedicada a ti, t'estimo.

ÍNDICE



	Índice
Resumen	5
Agradecimientos	9
Índice	13
Abreviaturas	21
Introducción	27
1. El retículo endoplasmático	29
1.1. Estructura y características del retículo endoplasmático	29
1.2. Dinámica reticular	31
1.3. Funciones del retículo endoplasmático	31
2. Las mitocondrias	35
2.1. Estructura y características de las mitocondrias	36
2.2. Dinámica mitocondrial	37
2.3. Bioenergética y metabolismo mitocondrial	40
2.4. Otras funciones de las mitocondrias	44
3. Contactos mitocondria – retículo endoplasmático	48
3.1. Membranas del retículo endoplasmático asociadas a mitocondrias	48
3.2. Comunicación mediante Ca^{2+}	54
3.3. Otras funciones de las MAMs	57
4. Las Mitofusinas 1 y 2	60
4.1. Estructura, dominios y mecanismos de interacción de las Mitofusinas	60
4.2. Funciones biológicas de las Mitofusinas	65
4.3. Doble localización de proteínas en RE y mitocondrias	68
5. El sistema nervioso	71
5.1. Formación del SNC	72
5.2. El crecimiento neurítico	74
5.3. Implicación del ER y las mitocondrias en el crecimiento neurítico	77

	Índice
5.4. El sistema glutamatérgico y la excitotoxicidad	80
5.5. Enfermedades neurológicas relacionadas con Mitofusina 2	85
Materiales y métodos	89
1. Modelos animales	91
1.1. Ratas	91
1.2. Ratones	92
2. Cultivos primarios de neuronas corticales y astrocitos	95
2.1. Preparación de medios y soluciones	96
2.2. Preparación del <i>coating</i>	97
2.3. Realización del cultivo a partir de cortezas cerebrales murinas	98
2.4. Tratamiento con el inhibidor de la mitosis "AraC"	101
2.5. Tratamiento con tamoxifeno	102
3. Cultivos de líneas celulares	103
3.1. Preparación de medios y soluciones	104
3.2. Descongelación de células	105
3.3. Mantenimiento y pase de líneas celulares	105
3.4. Congelación de células	107
4. Técnicas de manipulación de ADN	108
4.1. Transformación bacterias competentes	108
4.2. Extracción y purificación de ADN plasmídico	109
4.3. Cuantificación de ADN	110
4.4. Reacción en cadena de la polimerasa ("PCR")	111
4.5. Electroforesis en gel de agarosa	112
4.6. Clonación de ADN	114
4.7. Mutagénesis dirigida	117
4.8. Comprobación de secuencias de ADN	118

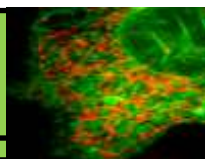
	Índice
4.9. Transfección celular transitoria	119
4.10. Generación de las formas de mitofusinas con dominios modificados	122
5. Cuantificación de proteína	124
6. Western blot	125
6.1. Preparación de la muestra	125
6.2. Electroforesis SDS-PAGE	126
6.3. Transferencia de proteínas a la membrana	128
6.4. Bloqueo de la membrana	129
6.5. Inmunodetección	130
6.6. Borrado de la membrana	131
6.7. Densitometría	132
7. Análisis de expresión génica	133
7.1. Aislamiento de ARN	134
7.2. Síntesis de ADNc	134
7.3. Reacción de qPCR	135
8. Análisis de la actividad transcripcional	137
9. Técnicas histológicas	137
9.1. Tinción de Golgi	138
9.2. Realización de cortes histológicos	139
10. Separación celular por citometría de flujo	140
11. Proximidad mitocondria-RE mediante luminiscencia	143
12. Tasa de consumo de oxígeno	144
12.1. Medición mediante Seahorse XF Cell Mito Stress Test	144
12.2. Medición mediante MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay	146
13. Niveles de ATP	147
14. Microscopía de campo claro y de contraste de fases	148

	Índice
14.1. Seguimiento, viabilidad y contaje de cultivos celulares	148
14.2. Análisis morfométricos neuronales	149
15. Microscopía de fluorescencia y confocal	152
15.1. Fijación de muestras con paraformaldehido	153
15.2. Inmunofluorescencia	153
15.3. Potencial de membrana mitocondrial	155
15.4. Colocalización mitocondria-RE mediante coeficiente de Manders	157
15.5. Morfología mitocondrial	159
15.6. Medidas de Ca ²⁺	160
15.7. Análisis morfométricos neuronales	163
15.8. Determinación de la viabilidad	164
16. Microscopia electrónica de transmisión	165
17. Materiales, equipos y servicios utilizados	166
17.1. Anticuerpos primarios	166
17.2. Anticuerpos secundarios	167
17.3. Plásmidos	167
17.4. Primers y vectores	167
17.5. siRNA	168
17.6. Enzimas, reactivos y productos varios	169
17.7. Medios comerciales, suplementos y sales	170
17.8. Soluciones	171
17.9. Kits	171
17.10. Equipos	172
17.11. Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona	172
18. Análisis estadísticos	173
Objetivos	175

Resultados	179
1. Estudio del mecanismo de regulación de la bioenergética mitocondrial a través de Mfn2	181
1.1. La falta de Mfn2, pero no de Mfn1, causa alteraciones en la bioenergética mitocondrial de manera independiente a su morfología	181
1.2. El estrés del RE y la mitofagia no son los mecanismos por los cuales Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial	187
1.3. La falta de Mfn2, pero no de Mfn1, produce alteraciones en las MAMs y en el transporte de Ca^{2+} entre RE y mitocondrias	191
1.4. La unión artificial RE-mitocondrias corrige los defectos en la bioenergética mitocondrial y la homeóstasis del Ca^{2+}	200
1.5. La activación de la bioenergética mitocondrial por ChiMERA requiere de la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias	208
2. Estudio de la interacción entre mitofusinas y su implicación en la bioenergética mitocondrial	214
2.1. La presencia de Mfn2 en el RE activa la bioenergética mitocondrial	214
2.2. La interacción homotípica entre mitofusinas es más eficiente que la heterotípica para su función enlazadora en las MAMs	220
2.3. La localización de Mfn1 en el RE no permite restaurar las alteraciones en la bioenergética mitocondrial causadas por la falta de Mfn2	226
2.4. La expresión de mitofusinas incompletas, con dominios combinados o mutaciones no es efectiva en la recuperación bioenergética de células Mfn2KO	229
3. Implicación de la regulación de la bioenergética mitocondrial a través de Mfn2 en el desarrollo neuronal	236
3.1. Mfn2 es importante en el establecimiento de contactos RE-mitocondrias durante el desarrollo neuronal	236
3.2. La función enlazadora de Mfn2 promueve un correcto crecimiento neurítico durante el desarrollo neuronal	239
3.3. La falta de Mfn2 afecta negativamente la formación de espinas dendríticas y altera la actividad sináptica	241

	Índice
4. Implicación de la regulación de las MAMs a través de Mfn2 en eventos excitotóxicos	245
4.1. La expresión de ChiMERA permite obtener un menor reclutamiento de Bax en las mitocondrias frente a un insulto excitotóxico	246
4.2. La expresión de las formas HR1 o HR1c disminuyen el reclutamiento de Bax en las mitocondrias frente a un insulto excitotóxico	248
Discusión	251
1. La función enlazadora de Mfn2 permite la activación de la bioenergética mitocondrial a través de la regulación de las MAMs y la transferencia de Ca ²⁺	253
2. Estudio de la interacción entre mitofusinas en la regulación de la bioenergética mitocondrial	259
3. La función enlazadora de Mfn2 promueve el crecimiento neurítico mediante su control de la bioenergética mitocondrial	267
4. La función enlazadora de Mfn2 parece modular el reclutamiento de Bax en las mitocondrias frente a un insulto excitotóxico	273
Conclusiones	279
Bibliografía	283
Anexo	319

ABREVIATURAS



ADN = Ácido desoxiribonucleico

ARN = Ácido ribonucleico

ATP = Adenosín trifosfato

ChiMERA = *Construct helping in mitochondria-ER association*

CICR = *Calcium-induced calcium release*

CMT2A = Charcot-Marie-Tooth tipo 2A

CMV = Citomegalovirus

Da = Daltons

DAPI = 4,6-diamidino-2-fenilindol

DIV = Días *in vitro*

DKO = Doble *knockout* de Mfn1 y Mfn2

dNTPs = Desoxinucléotidos trifosfato

GFP = *Green Fluorescent Protein*

GTP = Guanosín trifosfato

HRP = Peroxidasa de rábano

IP₃ = Inositol 1,4,5-trifosfato

IP₃R = Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato

LB = *Lyosgeny Broth* o Caldo de Lisogenia

MAMs = Membranas asociadas a las mitocondrias

MCU = *Mitochondrial calcium uniporter*

MEF = Fibroblasto embrionario de ratón

Mfn1 = Mitofusina 1

Mfn1KO = *Knockout* de Mfn1

Mfn2 = Mitofusina 2

Mfn2KO = *Knockout* de Mfn2

MME = Membrana mitocondrial externa

MMI = Membrana mitocondrial interna

MMP = Potencial de membrana mitocondrial

OCR = Tasa de consumo de oxígeno

o/n = *Overnight*

pb = Pares de bases

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

PDH = Piruvato deshidrogenasa

P/E = Penicilina/Estreptomicina

PIP₂ = Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PTPm = Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial

PVDF = Fluoruro de polivinilideno

qPCR = Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RBD = Dominio de unión a Ras

RCR = *Respiratory control ratio*

RE = Retículo endoplasmático

RFP = *Red Fluorescent Protein*

RLuc = Luciferasa *Renilla*

ROI = Región de interés

ROS = Especies reactivas de oxígeno

RyR = Receptor de rianodina

SCR = *Spare respiratory capacity*

SEM = Error estándar de la media

SNC = Sistema nervioso central

TA = *Tail-anchored*

TMRM = *tetramethylrhodamine methylester*

U.A. = Unidades arbitrarias

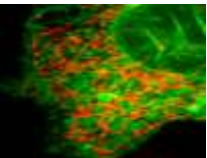
UPR = Respuesta a proteínas desplegadas

UV = Ultravioleta

VDAC = Canales aniónicos dependientes de voltaje

WT = *Wild-type*

INTRODUCCIÓN



El hecho de que las células desempeñen correctamente sus funciones biológicas está íntimamente asociado con su organización interna, donde se encuentran gran cantidad de estructuras subcelulares con diferentes funciones especializadas. Estas estructuras subcelulares, llamadas orgánulos, además de determinar un comportamiento celular adecuado a través de sus funciones especializadas, también determinan la progresión de las enfermedades y una infinidad de interacciones entre biomoléculas, las cuales definen la vida en sí (Satori et al. 2013). Por lo tanto, no es de extrañar que el estudio de la organización, funcionalidad y comunicación entre sí de los orgánulos, haya sido y continúe siendo uno de los mayores temas de investigación en el campo de la biología celular.

1. El retículo endoplasmático

1.1. Estructura y características del retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es el orgánulo que posee mayor tamaño, llegando a ocupar más del 50% de la célula en algunos tipos celulares (Jacquemyn et al. 2017). Este orgánulo presenta una estructura compleja compuesta por una bicapa lipídica plegada, la cual conforma una envoltura nuclear conectada a una red dinámica de láminas planas y túbulos (Fig.1), llamada también RE periférico (Westrat et al. 2015). Alrededor del núcleo celular se apilan dos bicapas lipídicas para formar las membranas nucleares interna y externa, las cuales mantienen la forma gracias a proteínas de unión a cromatina y lamina, proteínas enlazadoras que se encuentran entre ambas membranas, poros nucleares y citoesqueleto (Hetzer et al. 2005). A partir de la membrana nuclear externa, la membrana se expande formando el RE periférico, con el cual comparte el lumen. Las láminas planas del RE periférico se observan típicamente con una conformación apilada, con las distintas membranas conectadas entre sí mediante recodos formados en las mismas, permitiendo que sean empaquetadas de manera que se obtenga una eficiencia máxima (Terasaki et al. 2013). En la parte citosólica de la membrana lipídica de las láminas se encuentran una gran cantidad de ribosomas incrustados, mientras que en los túbulos no, de ahí que las láminas se observen mediante microscopia electrónica con un típico relieve rugoso y los túbulos con relieve liso (Voeltz et al. 2002), hecho que da nombre al RE rugoso y RE liso,

respectivamente. Esto se debe a que las láminas conforman la localización primaria de los procesos de traducción, traslocación, modificación postraduccional y plegamiento de las proteínas integrales de membrana y las proteínas secretadas, una de las principales funciones del RE (Shibata et al. 2006). Aunque las láminas suelen ser más estables, ya que deben permitir la estabilización de los complejos para la síntesis proteica unidos a la membrana, los túbulos son altamente dinámicos, formándose y reorganizándose continuamente. La estructura reticular clásica que adopta el RE gracias a los túbulos le permite llegar a casi todo el volumen intracelular, pero manteniendo espacio suficiente para que los demás orgánulos se mantengan y se muevan a su alrededor (Friedman & Voeltz 2011). Una de las principales diferencias entre las láminas y los túbulos es que la superficie de los túbulos tiene forma curva mientras que la de las láminas es mayoritariamente plana. Este hecho significa que los túbulos tienen un mayor ratio superficie-volumen, por lo que los presta a ser más adecuados para funciones dependientes de superficie, mientras que las láminas son más adecuadas para albergar procesos luminales. Así pues, en cada una de las distintas estructuras que conforman la red, se realizan funciones diversas y especializadas (Schwarz & Blower 2016).

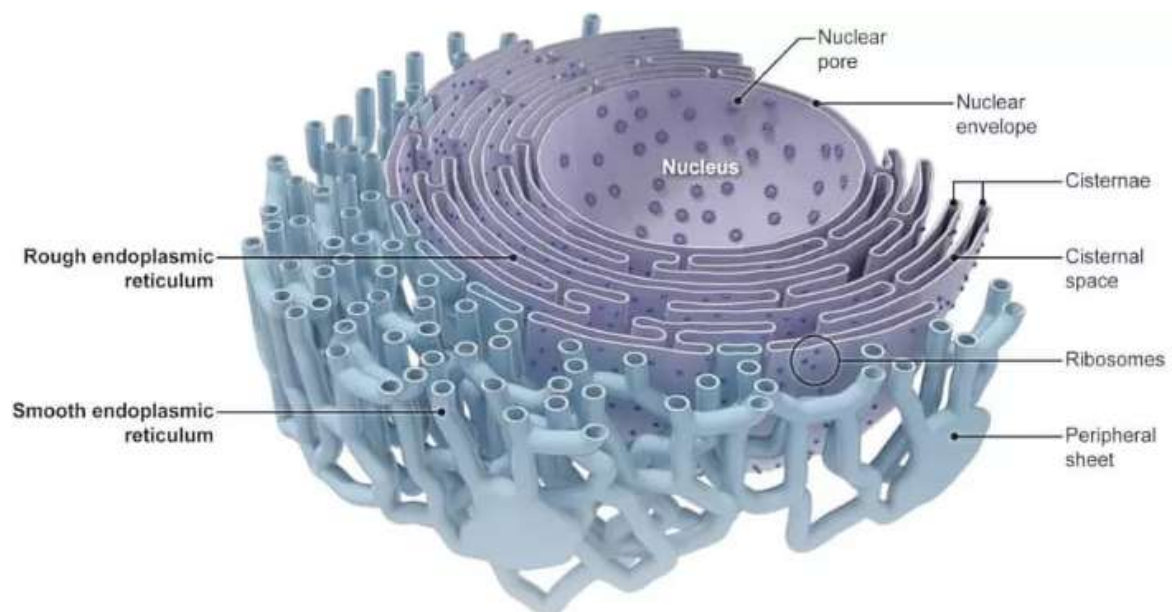


Figura 1. Imagen representativa de las tres estructuras que conforman el retículo endoplasmático: envoltura nuclear, retículo endoplasmático liso y retículo endoplasmático rugoso. Imagen de (Blackstone & Prinz 2016).

1.2. Dinámica reticular

Al ser el RE una estructura dinámica, según los requerimientos o el estado de la célula en un determinado momento, se reflejará en cambios en la estructura del mismo. Desde hace años se conoce que la mayoría de los procesos por los cuales se dirige la dinámica del RE recaen mayoritariamente a su asociación con los microtúbulos del citoesqueleto (Terasaki et al. 1986), aunque también con los filamentos de actina (Gurel et al. 2014). No obstante, con el paso de los años se ha descubierto que la regulación de la dinámica del RE no solo depende del citoesqueleto, sino que existen diferentes tipos de proteínas en las membranas del RE que modelan la forma del mismo y que contribuyen de igual forma en los procesos dinámicos del RE (Shibata et al. 2008). Aunque se conoce generalmente de qué manera se regula la arquitectura del RE, aún no se sabe del todo a qué señales o procesos celulares responden exactamente los cambios en la dinámica del RE. El ratio láminas-túbulos varía en diferentes tipos celulares y refleja la distinta funcionalidad que presentan estas dos estructuras. Por ejemplo, células con gran capacidad secretora de proteínas, como son las pancreáticas, presentan una mayor cantidad de láminas apiladas (Terasaki et al. 2013), mientras que células que secretan pocas proteínas, como por ejemplo las neuronas, contienen una red tubular más abundante (Baumann & Walz 2001).

1.3. Funciones del retículo endoplasmático

En lo relativo a su función, tal y como se ha comentado, según el tipo de estructura, el RE realiza distintas funciones especializadas, y dependiendo del tipo celular y sus necesidades fisiológicas, una u otra función será más o menos predominante.

Función estructural

La envoltura nuclear del RE constituye principalmente una barrera física entre dos compartimentos funcionales que separan los procesos de transcripción de ADN a ARN (en el interior del núcleo) y de traducción de ARN a proteínas (en el citoplasma), regulando el paso de macromoléculas entre ambos compartimentos de manera estricta a través de los poros nucleares. Además, la envoltura nuclear también provee de lugares de anclaje a la cromatina y al citoesqueleto, hecho que ayuda a posicionar

el núcleo en el interior de la célula y los cromosomas dentro del núcleo, regulando además la expresión de ciertos genes (Hetzer et al. 2005). Este hecho es especialmente importante durante la mitosis, cuando la estructura del RE se remodela con el fin de ayudar a la segregación de los cromosomas (Friedman & Voeltz 2011).

Síntesis y plegado de proteínas

El RE rugoso (láminas) participa en la síntesis de proteínas secretadas y proteínas integrales de membrana, así como de una pequeña parte de proteínas citosólicas (Reid & Nicchitta 2015). Estas proteínas penetran al lumen del RE a través de canales específicos donde se ancla el complejo ribosoma:ARN:péptido durante su proceso de síntesis gracias a una señal de reconocimiento producida en el extremo amino-terminal del mismo. Seguidamente estas proteínas sufren un proceso de plegamiento y modificaciones postraduccionales, con la ayuda de chaperonas y enzimas lumbales. Dependiendo del destino de las proteínas, estas son ancladas en la bicapa lipídica o dirigidas a la vía secretora (Braakman & Hebert 2013).

Además, también desempeña una función de control de calidad ya que es capaz de detectar proteínas mal plegadas para plegarlas correctamente o activar el proteasoma para su degradación, si se detecta un plegamiento incorrecto persistente. Este último mecanismo se ejerce sin interrumpir la síntesis de proteínas y con el fin de evitar una posible agregación y acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas. No obstante, si esta acumulación sucede, fenómeno conocido como estrés del RE, el RE activa la respuesta a proteínas desplegadas (UPR). El estrés del RE puede aparecer en distintas condiciones patofisiológicas tales como hipoxia, pérdida de niveles basales de Ca^{2+} en el RE, daños oxidativos, hipoglucemia o infecciones virales, entre otras (Bhat et al. 2017). La UPR trata de recuperar, en un principio, el correcto funcionamiento de la célula, deteniendo la traducción e incrementando la producción de chaperonas y otros mecanismos pro-supervivencia mediante la activación de unos factores de transcripción concretos. Para ello se activan tres cascadas de señalización a través de tres sensores, como son las proteínas PERK, IRE1 y ATF6, las cuales se encuentran ancladas en el RE (Carreras-Sureda et al. 2017b). En condiciones fisiológicas normales, la chaperona BiP se encuentra unida al dominio luminal de estos sensores, de manera

que los inactiva, pero frente a una acumulación de proteínas mal plegadas, como ocurre en el estrés del RE, BiP procede a plegar estas proteínas mal plegadas y deja de inactivar a los sensores (Bhat et al. 2017). Entonces, de manera muy resumida, cuando se activa PERK, éste puede fosforilar a eIF2 α y activarlo. A su vez, p-eIF2 α reprime la traducción global de proteínas y facilita la expresión del factor de transcripción ATF4, encargado de mediar la expresión de los mecanismos pro-supervivencia. Por su parte, la activación de IRE1 permite, mediante un *splicing* concreto, el procesamiento de una forma de Xbp1 que genera un factor de transcripción, Xbp1s, que también se encarga de la expresión de los mecanismos pro-supervivencia. Finalmente, la activación de ATF6 promueve su translocación al aparato de Golgi, donde es procesado por proteasas y redirigido al núcleo, para actuar como factor de transcripción de los mecanismos pro-supervivencia (Fig.2) (Carreras-Sureda et al. 2017b).

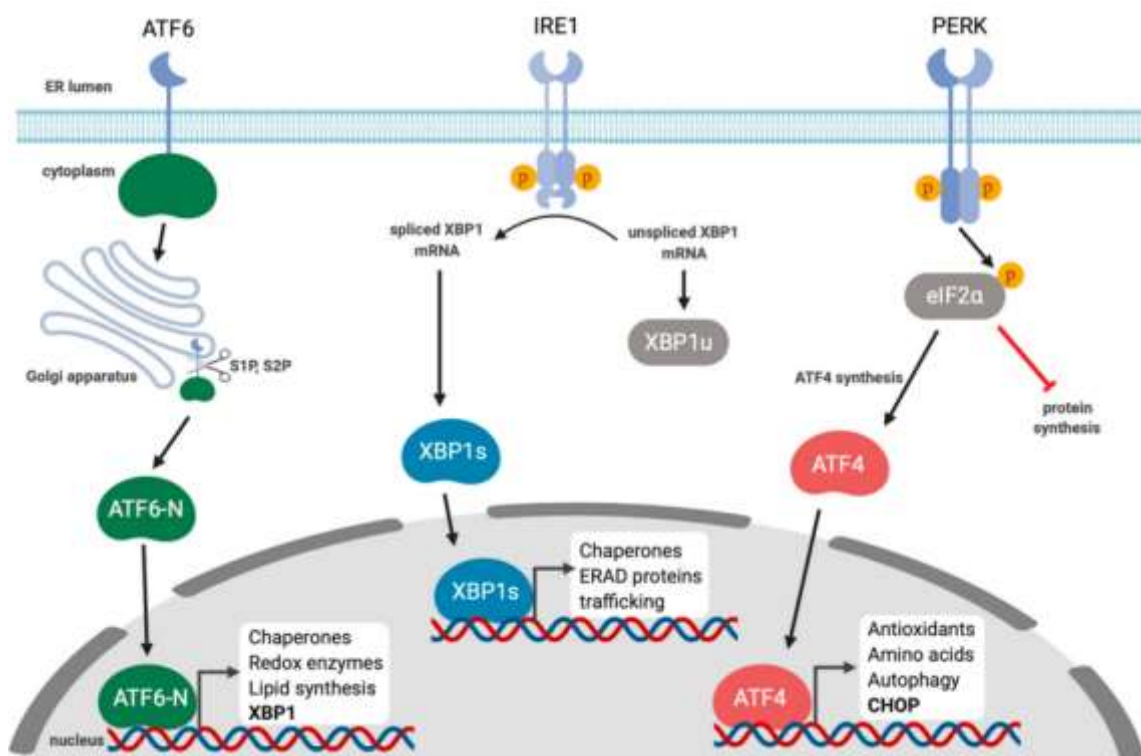


Figura 2. Vías de señalización activadas en la respuesta al estrés del RE (UPR). Imagen modificada de (Johnston & McCormick 2019).

No obstante, si esta primera respuesta no es suficiente, la anomalía persiste y el estrés del RE es irreparable, se realiza un cambio de las vías pro-supervivencia hacia una vía pro-apoptótica intrínseca mediante la activación de caspasas, en la cual las

mitocondrias están involucradas (Malhotra & Kaufman 2007). Aunque el mecanismo molecular que provoca el cambio hacia estas vías pro-apoptóticas todavía no se conoce del todo, se sabe que algunas de las proteínas que forman parte de las propias vías pro-supervivencia pueden actuar como sensores frente al excesivo estrés en el RE y desencadenar el proceso de muerte celular (Bhat et al. 2017). Este es el caso de la proteína CHOP, expresada mediante el factor de transcripción ATF4 (Han et al. 2013).

Síntesis de lípidos

En el RE liso (túbulos) se producen los lípidos fundamentales de las membranas, así como los fosfolípidos, el colesterol o los triacilglicéridos. Estos lípidos sintetizados son distribuidos a otros orgánulos a través de la vía secretora, por gotitas lipídicas que brotan del RE o mediante contacto físico entre membranas (Jackson et al. 2016). Aunque la síntesis de lípidos ha sido tradicionalmente considerada como una función específica del RE liso y hay resultados que apoyan el hecho de que enzimas de síntesis lipídica se concentran en ciertas regiones del mismo para hacer más eficiente su síntesis, no hay evidencias claras de que sea una función específica de este dominio y que estas enzimas no se encuentren también en el resto de RE (Jacquemyn et al. 2017).

Homeostasis del calcio

El RE liso, mayoritariamente, también es el mayor almacén intracelular de Ca^{2+} , siendo la concentración típica de Ca^{2+} citosólico alrededor de 100 nM y en el lumen del RE entre 100-800 μM , por lo que juega un importante papel en su homeostasis (Samtleben et al. 2013). La entrada de Ca^{2+} en el RE se realiza mediante el bombeo del mismo a través de ATPasas SERCA. Además, el RE presenta unos canales, como son los receptores de rianodina (RyR) y los receptores de IP_3 (IP_3R), que permiten la salida del Ca^{2+} del RE al citosol. Existen tres miembros en la familia de los IP_3R , los cuales forman oligómeros para formar el canal, aunque no se conoce de manera clara las implicaciones y diferencias funcionales de cada uno (Parys & Vervliet 2020). El proceso se inicia cuando la fosfolipasa C se estimula a través de la activación del receptor acoplado a proteínas G, cuando los niveles de Ca^{2+} intracelulares son bajos. Ésta hidroliza el PIP_2 en diacilglicérol y IP_3 , el cual se une a su receptor permitiendo la salida

del Ca^{2+} del RE (Piedras-Renteria et al. 2012). Por su parte, los RyR actúan a través de un mecanismo inducido por la propia salida de Ca^{2+} (*CICR*, por sus siglas en inglés), ya que los RyR se activan por la unión de Ca^{2+} tras incrementos en niveles citoplasmáticos del mismo (Verkhatsky & Shmigol 1996). En mamíferos existen tres isoformas de RyR, las cuales predominan en distintos tipos celulares, como por ejemplo RyR1 en músculo esquelético, RyR2 en músculo cardíaco y RyR3 en células del sistema nervioso (Lanner et al. 2010). Aunque principalmente los RyR se expresan de manera abundante en células excitatorias, también se ha detectado, en menor nivel, en otros tipos celulares, como por ejemplo en fibroblastos embrionarios de ratón (*MEF*, por sus siglas en inglés) (Ruas et al. 2015; Augusto et al. 2020) o en fibroblastos humanos dérmicos y de pulmón (Yu et al. 2012; Mukherjee et al. 2012). No obstante, los canales IP_3R parecen ser la principal vía de liberación del Ca^{2+} del RE en fibroblastos (Roach & Bradding 2020).

El papel del RE liso en este proceso queda patente sobre todo en las células musculares estriadas, en las que adopta una conformación muy especializada nombrada retículo sarcoplásmico, en la cual se relaciona con los sarcómeros y túbulos T, actuando de reservorio de Ca^{2+} para poner en marcha la contracción muscular en respuesta a impulsos nerviosos (Franzini-Armstrong 1999). No obstante, no solo se almacena en el RE liso, ya el que lumen está conectado y en el RE rugoso el Ca^{2+} también determina el funcionamiento de numerosas enzimas relacionadas con el plegamiento y secreción de proteínas (Michalak et al. 2002). Por lo tanto, las diferentes estructuras no tienen funciones excluyentes, sino especializadas.

2. Las mitocondrias

Hace alrededor de dos mil millones de años, cuando la atmosfera de la tierra empezaba a ser rica en oxígeno, una α -proteobacteria fue endocitada por una arqueobacteria, la cual era incapaz de usar el oxígeno. De esta forma se estableció entre ambas una relación endosimbiótica, en la cual la bacteria adquirió protección y nutrición de la célula huésped y a cambio le suministraba a ésta la energía necesaria para satisfacer sus necesidades bioenergéticas. Este endosimbionte sería el precursor de lo que hoy se conoce como célula eucariota, por lo que las mitocondrias

provendrían de las α -proteobacterias ancestrales. Aunque las mitocondrias actuales siguen estando formadas por una doble membrana y mantienen la maquinaria fundamental para producir ATP, su composición general ha cambiado drásticamente y han adquirido una gran cantidad de funciones adicionales desde entonces (Alberts et al. 2014).

2.1. Estructura y características de las mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos semi-autónomos que contienen su propio genoma y maquinaria de síntesis proteica. Muchas células eucariotas contienen gran cantidad de mitocondrias, las cuales en conjunto ocupan una proporción poco despreciable del volumen citoplasmático. Aunque típicamente se representen en forma tubular, son orgánulos muy heterogéneos en relación a su forma, tamaño, número y localización, por lo que en diferentes tipos celulares el ratio número-volumen varía considerablemente según sus necesidades fisiológicas (Scheffler 2008).

Las mitocondrias tienen una arquitectura peculiar, pues está formada por un sistema de doble membrana, con una membrana mitocondrial interna (MMI) y una externa (MME) (Scheffler 2008). La MME es bastante homogénea en composición, compuesta sobre todo por fosfolípidos, contiene todo el orgánulo en sí y constituye la puerta de intercambio de gran variedad de moléculas con su entorno más inmediato (van der Laan et al. 2016). Un hecho característico de la MME es la presencia de una gran cantidad de porinas, también llamadas canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), que permiten libremente el paso de iones y moléculas de un máximo de 5KDa a través de la misma (Alberts et al. 2014). Las moléculas mayores, no obstante, pueden atravesar la membrana por una vía alternativa, constituida por translocasas (Kühlbrandt 2015). A parte de VDAC, en la MME se encuentra un gran número de otras proteínas importantes relacionadas con varias de las funciones realizadas por este orgánulo, como los complejos de importe de proteínas TOM, proteínas de transporte de lípidos, la proteína apoptótica Bak o las mitofusinas, entre otras (Walther & Rapaport 2009).

Entre las dos membranas existe una separación de aproximadamente 20 nm, la cual crea un pequeño sub-compartimento llamado espacio intermembrana. Este espacio

actúa como eje del transporte entre la matriz mitocondrial y el citosol, y alberga más de 100 proteínas distintas, como el citocromo c o las proteínas apoptóticas Smac/DIABLO (Herrmann & Riemer 2010).

A diferencia de la MME, la MMI conforma una barrera estricta que únicamente es permeable a pequeñas moléculas sin carga (Prasai 2017). Por lo tanto, la amplia mayoría de las moléculas necesitan ayuda de proteínas de transporte de membrana muy selectivas para atravesar la MMI (Kühlbrandt 2015), como los canales MCU. No obstante, la MMI está de sobras preparada, ya que está formada en un 75% por proteínas, constituyendo el mayor contenido proteico en cualquiera de las membranas celulares existentes (Scheffler 2008). Una de las características más importantes de la MMI es que favorece el establecimiento y mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial a través de la misma gracias a la presencia de la cadena de transporte de electrones, quedando el espacio intermembrana cargado positivamente (Kühlbrandt 2015). Además, la MMI es varias veces mayor en tamaño que la MME, dado que la MMI conforma invaginaciones hacia el interior de la matriz, llamadas crestas mitocondriales. Estas crestas permiten a la MMI aumentar su superficie, lo cual se correlaciona positivamente con la actividad respiratoria, ya que se ha observado mayor número de las mismas en células con mayor demanda energética, como son las musculares (Pernas & Scorrano 2015).

Finalmente, envuelta por la MMI se encuentra la matriz mitocondrial, una región densa en proteínas que contiene una alta concentración de enzimas involucradas en el metabolismo de sustratos y múltiples copias del ADN mitocondrial (Alberts et al. 2014). Además, la matriz mitocondrial posee un mayor pH y una carga eléctrica más negativa que el espacio intermembrana, hecho que permite fomentar la síntesis de ATP mediante la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa en las crestas mitocondriales (Zhao et al. 2019).

2.2. Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que se fusionan y dividen constantemente de manera coordinada, lo cual es importante para la herencia genética mitocondrial y el mantenimiento de sus funciones (Westermann 2010). Los eventos de fusión y fisión

mitocondrial están orquestados por una serie de GTPasas de la familia de las dinaminas: las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y 2) y Opa1, en la fusión, y la proteína Drp1, en la fisión (Wai et al. 2016).

La fusión mitocondrial está constituida por dos mecanismos contiguos que funcionan generalmente de manera coordinada, en los cuales primero se lleva a cabo la fusión de la MME y después de la MMI (Tilokani et al. 2018), aunque pueden operar de manera independiente si se requiere (Meeusen et al. 2004). Las encargadas de llevar a cabo la fusión de la MME son las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2), las cuales se encuentran ancladas en la propia MME por dos dominios transmembrana. Se ha comprobado que la pérdida de ambas mitofusinas de manera individual afecta negativamente a la elongación mitocondrial, teniendo un mayor impacto la deficiencia de Mfn1 debido a su mayor actividad GTPasa (Ishihara et al. 2004). La sobreexpresión de Mfn1 en células deficientes en Mfn2 y viceversa, restablece la fusión mitocondrial (Chen et al. 2003). De manera general, este primer mecanismo sigue tres pasos (Fig.3). Primeramente, las mitofusinas de dos mitocondrias distintas interactúan de manera homotípica o heterotípica entre ellas, permitiendo el acercamiento de ambas membranas (*tethering stage*). Después, las mitofusinas sufren un cambio de conformación mediante la hidrólisis de GTP que acerca aún más las dos membranas, ensamblándolas y generando una especie de anillo de acoplamiento (*docking stage*). Finalmente, gracias a una nueva hidrólisis de GTP, se dan nuevos cambios conformacionales en las mitofusinas que permiten la fusión de las dos MME (Brandt et al. 2016) (para una explicación más detallada del mecanismo de interacción de las mitofusinas en la fusión de la MME, ver sección 4.1.).

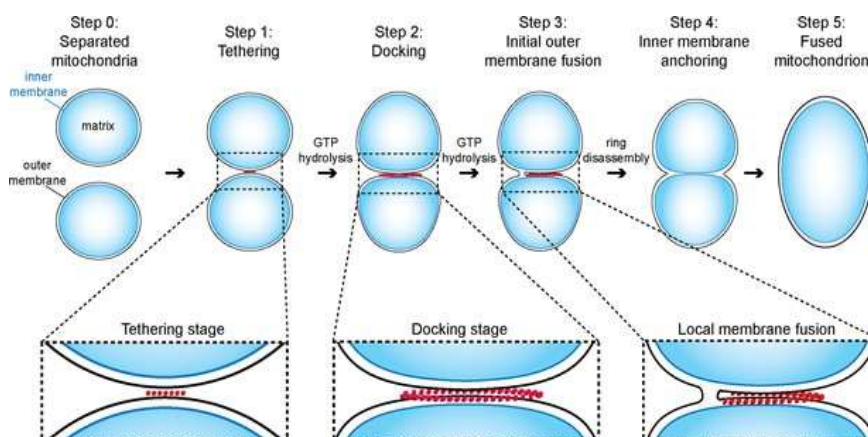


Figura 3. Proceso esquemático de fusión mitocondrial. Se observa hasta el paso 3 los distintos mecanismos de la fusión de la MME, donde los puntos rojos corresponden a las mitofusinas, y el paso 4 la fusión de la MMI, donde interviene la proteína Opa1. Imagen de (Brandt et al. 2016).

Por lo que hace la fusión de la MMI, está dirigida principalmente por Opa1, proteína que está insertada en la MMI pero que tiene la mayor parte expuesta en el espacio intermembrana. La importancia de esta proteína para el proceso de fusión mitocondrial queda patente en estudios que demuestran que la pérdida de la misma provoca fragmentación mitocondrial, mientras que su sobreexpresión induce mayor elongación (Griparic et al. 2004). No obstante, no se conoce la función de la mayoría de los dominios de esta proteína durante la fusión, a excepción del dominio GTPasa, su dominio efector y un dominio PH que interacciona con membranas lipídicas (Li et al. 2019). Desde hace unos pocos años se empieza a entender la implicación de las múltiples isoformas que se generan a partir *splicing* alternativo y de digestión por metaloproteasas, las cuales responderían a estímulos relacionados con el estado metabólico y el estrés celular (Wai et al. 2016). Por lo que hechos como que Opa1 dependa de Mfn1 para realizar su función, pero no de Mfn2 (Cipolat et al. 2004), carecen todavía hoy de respuestas claras.

Por último, el proceso de fisión consiste en un único mecanismo de múltiples pasos en el que Drp1 juega un papel clave. De igual forma que las proteínas de fusión, la pérdida de Drp1 conlleva un efecto drástico en la morfología mitocondrial, en este caso promoviendo una mayor elongación de las mismas (Ishihara et al. 2009). Esta proteína, a diferencia de las proteínas de fusión, se encuentra principalmente en el citosol y se dirige hacia las mitocondrias para llevar a cabo el proceso de fisión cuando es necesario (Kraus & Ryan 2017). Su localización subcelular y otras propiedades funcionales pueden ser moduladas mediante diversas modificaciones post-traduccionales, tales como fosforilaciones, ubiquitinizaciones o SUMOilaciones, entre otras (Adaniya et al. 2019). Cuando Drp1 localiza en las mitocondrias forma a su alrededor una estructura parecida a un anillo, promoviendo un estrechamiento de la misma. Entonces, la hidrólisis de GTP por parte de Drp1 aumenta el estrangulamiento, marcando esa zona como un potencial lugar de escisión (Kraus & Ryan 2017). Aunque el papel de Drp1 en el estrechamiento se ha descrito múltiples veces y está aceptado, su capacidad para finalizar el proceso de fisión por sí sola ha sido cuestionada desde hace tiempo (Yoon et al. 2001). En contrapartida, se ha descrito que la proteína Dnm2, otra GTPasa que ensambla una estructura en forma de collar alrededor del lugar de

escisión, es la que ejecuta finalmente la escisión aprovechando la formación de los anillos por parte de Drp1, ya que la pérdida de Dnm2 induce elongación mitocondrial con presencia de lugares muy estrechos, correspondientes a los lugares de escisión (Lee et al. 2016).

2.3. Bioenergética y metabolismo mitocondrial

Las mitocondrias proveen a la célula de energía en forma de ATP como resultado final de la oxidación de nutrientes en el ciclo del ácido cítrico (o ciclo de Krebs) o la oxidación de ácidos grasos (Chance & Williams 1955). Un claro ejemplo del importante papel energético que desempeñan las mitocondrias en las células es el ratio volumen de mitocondrias por célula, el cual está regulado para satisfacer la demanda energética de los distintos tipos celulares (Mishra & Chan 2016a). En cardiomiocitos, los cuales tienen altos requerimientos energéticos, aproximadamente un 35% de su volumen está ocupado por mitocondrias (Dedkova & Blatter 2012), mientras que en hepatocitos, los cuales no requieren tanta energía, las mitocondrias apenas superan el 15% de su volumen (Khraiwesh et al. 2014).

Para ello, la oxidación de nutrientes provee electrones a la cadena de transporte de electrones, constituida por 4 complejos, en forma de NADH y FADH₂. El transporte secuencial de electrones del complejo I o II hacia el III y IV bombea protones hacia la matriz del espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico que resulta en una diferencia de carga (más negativa en la matriz mitocondrial), lo que se conoce como potencial de membrana mitocondrial (MMP). Finalmente, la ATP sintasa bombea de nuevo los protones hacia la matriz mitocondrial a favor de gradiente, aprovechando la energía generada para sintetizar ATP (Fig.4) (Scheffler 2008). Este proceso viene determinado por tres parámetros distintos: (1) la renovación del ATP, determinado por el consumo celular de ATP y los niveles de ADP en la matriz, (2) el uso de sustratos, determinado por su disponibilidad en la matriz mitocondrial y su oxidación para generar NADH y FADH₂, (3) la fuga de protones, los cuales disipan el MMP y viene determinado por la permeabilidad intrínseca de la MMI a los protones (Liesa & Shirihai 2013).

Una aportación continua de NADH y FADH_2 procedentes de la oxidación de nutrientes, va a proveer a la mitocondria de un flujo continuo de electrones para generar un MMP que permita la síntesis de ATP mediante el bombeo de nuevo de protones hacia la matriz mitocondrial, siempre que exista demanda de ATP, y de esta forma satisfacer

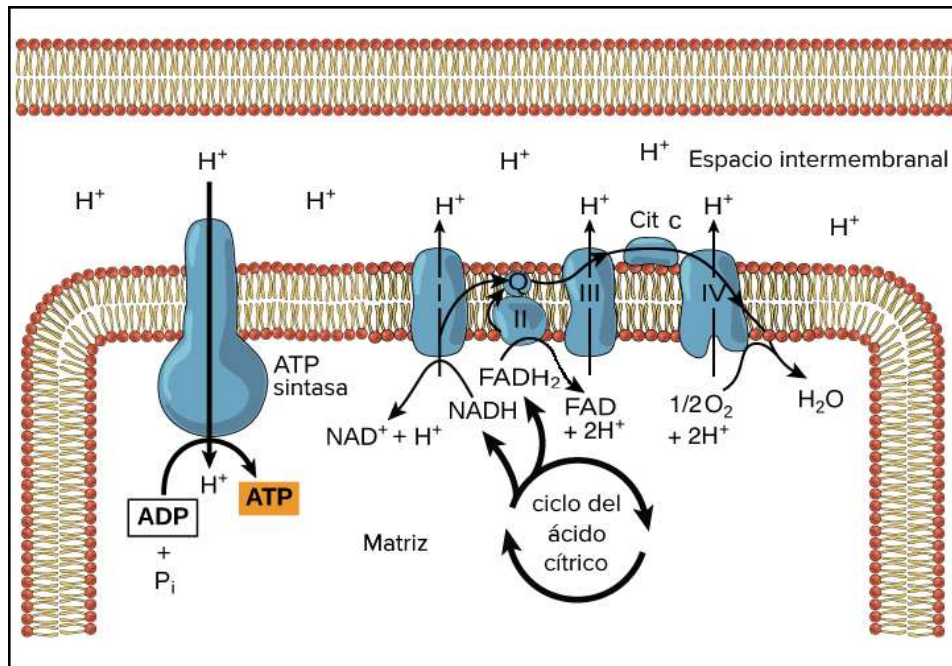
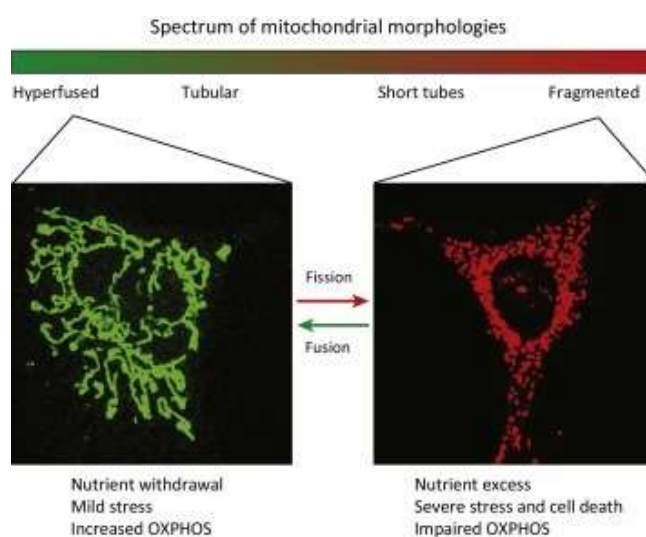


Figura 4. Imagen representativa del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, generación del potencial de membrana mitocondria y síntesis de ATP. Imagen modificada de *Openstax College Biología*.

los requerimientos energéticos de la célula (Zorova et al. 2018). Normalmente, las células mantienen niveles estables de ATP y MMP en condiciones normales, y su mantenimiento es un requisito para el correcto funcionamiento celular y supervivencia, sobre todo en aquellas con altos requerimientos energéticos (Zamzami et al. 1995). Por lo tanto, la pérdida del mismo, es un indicador de disfunción mitocondrial y de un estado celular comprometido (Wang et al. 2019). El establecimiento del MMP, estando la matriz mitocondrial más cargada negativamente que el espacio intermembrana, permite un transporte hacia la matriz de la mitocondria de cationes importantes para desempeñar funciones mitocondriales, como es el caso del Ca^{2+} , el cual regula positivamente la propia respiración mitocondrial y es un intermediario del metabolismo mitocondrial (Hansford & Zorov 1998).

No obstante, una célula puede ajustar su capacidad y eficiencia de producción de ATP en respuesta a cambios en la demanda de energía y suministro de nutrientes, no solo modulando los procesos que impliquen directamente los tres parámetros que determinan la respiración mitocondrial, sino mediante otros procesos que actuarían de manera más indirecta, como es la dinámica mitocondrial. Por ejemplo, se ha demostrado que células expuestas a un entorno con exceso de nutrientes tienden a mantener sus mitocondrias más separadas y fragmentadas, mientras que células expuestas a un entorno pobre en nutrientes tienden a mantener sus mitocondrias elongadas y conectadas (Molina et al. 2009). Y es que la importancia de la dinámica mitocondrial no solo radica en el correcto mantenimiento de las funciones mitocondriales, sino que también les confiere a las mitocondrias un mecanismo de respuesta adaptativa en función del estado metabólico de la célula, mediante el cual modulan su capacidad y eficiencia bioenergética mitocondrial (Wai et al. 2016). Comúnmente se asocia la morfología mitocondrial con múltiples condiciones fisiológicas o patológicas, como por ejemplo una morfología fragmentada a menudo se relaciona con disfunción mitocondrial, estrés o muerte celular (Liesa et al. 2009). Por su parte, una morfología más tubular se cree que permite una mejor distribución de los componentes de la matriz y consiguiente estimulación de la actividad bioenergética (Mishra & Chan 2016a). Aunque este último mecanismo concreto está en debate, sí que está ampliamente aceptado el hecho de relacionar la morfología mitocondrial con el estado bioenergético mitocondrial. Además, múltiples vías de señalización regulan la maquinaria de dinámica mitocondrial para adaptar la arquitectura mitocondrial en



función a las condiciones metabólicas o fisiológicas de la célula (Fig.5) (Westermann 2012).

Figura 5. Adaptación de la morfología mitocondrial según su estado bioenergético o las condiciones metabólicas o fisiológicas de la célula. Imagen de (Wai et al. 2016).

Por otro lado, las mitocondrias disponen de un mecanismo de control de calidad, el cual contribuye a largo plazo al mantenimiento de una población mitocondrial sana y con capacidad bioenergética en condiciones óptimas. Este mecanismo relaciona los procesos de dinámica, bioenergética mitocondrial y mitofagia (Fig.6) (Pickles et al. 2018). De manera general, cuando se divide una mitocondria (2), se generan dos mitocondrias con potencial de membrana dispares, estando una de ellas bioenergéticamente comprometida (3). Esta nueva mitocondria puede seguir entonces dos caminos, si su sistema bioenergético funciona correctamente, recupera el potencial y puede unirse de nuevo a la red mitocondrial mediante fusión (1), pero si está deteriorada, se mantiene despolarizada y aislada de la red (4), hecho que desencadenará la mitofagia (5), el proceso de autofagia selectiva de mitocondrias (Ni et al. 2015). De este modo, se eliminan mitocondrias que son disfuncionales por desgaste, por una biogénesis defectuosa o por daños producidos por exceso de ROS, y que comprometen la funcionalidad del resto de la red mitocondrial y por tanto, de la integridad de la célula (Pickles et al. 2018).

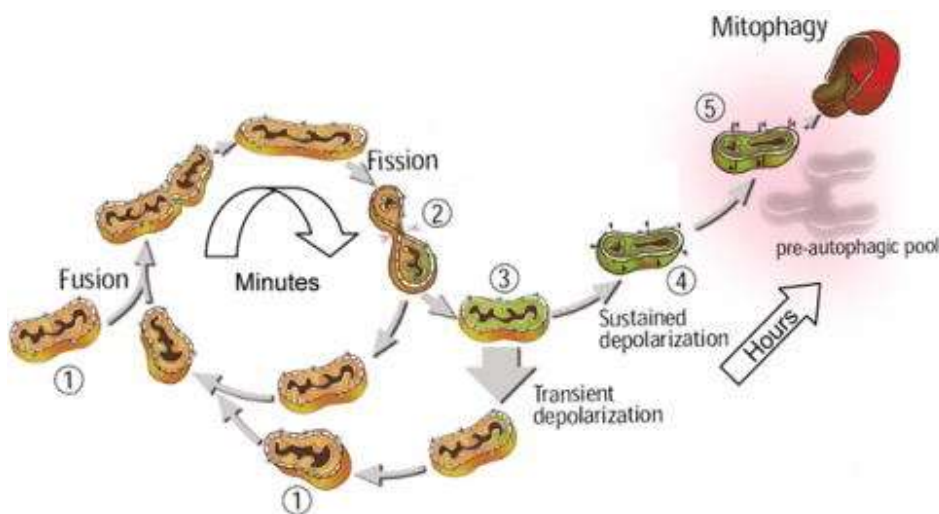


Figura 6. Imagen representativa del control de calidad mitocondrial, mecanismo en el cual actúan de manera coordinada los procesos de dinámica mitocondrial, bioenergética mitocondrial y mitofagia. Imagen modificada de (Liesa & Shirihai 2013).

De manera resumida, en este proceso celular, el reconocimiento de las mitocondrias que deben ser eliminadas por los autofagosomas se realiza mediante unas proteínas llamadas LC3, y puede ocurrir de manera dependiente o independiente a ubiquitina. En el mecanismo independiente de ubiquitina, LC3 es reclutado hacia las mitocondrias

mediante adaptadores que actúan como sensores de daño mitocondrial o a través de receptores de la membrana mitocondrial que directamente interactúan con LC3 (Yoo & Jung 2018). En el mecanismo dependiente de ubiquitina, frente a la despolarización de la membrana mitocondrial se reduce la degradación de la proteína PINK1, que se acumula en la MME. Allí, PINK1 se autofosforila y recluta a la proteína Parkin, la cual realiza la poli-ubiquitinización de sus substratos, entre los cuales se encuentran proteínas adaptadoras mitocondriales que permiten la unión de LC3 (Lazarou et al. 2015). Por otro lado, Parkin también poli-ubiquitina otras proteínas como las mitofusinas 1 y 2, lo cual promueve su degradación por el proteasoma e induce una mayor fragmentación mitocondrial (Tanaka et al. 2010) y pérdida de contactos RE-mitocondria (McLelland et al. 2018), facilitando así la degradación mitocondrial. La estrecha relación entre la mitofagia y el mantenimiento de la capacidad bioenergética mitocondrial queda patente en diferentes modelos de pérdida de función de PINK1/Parkin, los cuales manifiestan alteraciones bioenergéticas (Melser et al. 2015).

2.4. Otras funciones de las mitocondrias

Las mitocondrias típicamente se han descrito como los motores energéticos de la célula, debido a su papel esencial en la producción de ATP para sustentar los requerimientos energéticos celulares, tal como ya se ha comentado anteriormente. No obstante, esta no es la única función de las mitocondrias, sino que desempeña muchas más funciones igual de útiles e importantes para las células.

Homeostasis del calcio

Las mitocondrias también desempeñan un papel clave en la homeostasis y transporte de Ca^{2+} , el cual está dirigido por el gradiente electroquímico que se genera alrededor de la MMI (Duchen 2000). El Ca^{2+} atraviesa la MME libremente a través de los canales VDAC y puede entrar en la matriz celular a través de un canal específico de la MMI, llamado MCU (De Stefani et al. 2011; Baughman et al. 2011). Aunque parezca paradójico, este canal presenta baja afinidad por el Ca^{2+} , pero este hecho está relacionado con la regulación de la captación de Ca^{2+} (Marchi & Pinton 2014). A parte de ayudar a la homeostasis del Ca^{2+} citoplasmático mediante su captación, una vez dentro de la mitocondria, el Ca^{2+} lleva a cabo la activación directa de distintas

deshidrogenasas mitocondriales como son la piruvato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa, la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Denton et al. 1980; Glancy & Balaban 2012; Sassano et al. 2017), estas tres últimas pertenecientes al ciclo del ácido cítrico. Además también activa varios complejos de la cadena de transporte de electrones, aumentando de este modo la producción de ATP (Glancy et al. 2013). No obstante, una mayor captación de Ca^{2+} no significa siempre una mayor activación de la bioenergética mitocondrial. Bajo condiciones patológicas, donde sucede una acumulación de Ca^{2+} en el citosol, las mitocondrias son capaces de captar grandes cantidades del mismo para intentar mantener la homeostasis de Ca^{2+} , pero superado un umbral se produce la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm) (Hunter & Haworth 1979). Estos poros son unos canales de gran conductancia situados en la MMI, los cuales si se mantienen abiertos de manera sostenida, desencadenan una respuesta de muerte celular (Di Lisa et al. 2011). Por lo tanto, para un correcto funcionamiento mitocondrial se requiere una captación precisa de Ca^{2+} , ya que poca captación compromete la bioenergética mitocondrial pero una captación excesiva puede conducir a procesos de muerte celular.

Regulación de la muerte celular

Tal como ya se ha introducido en la función de transporte de Ca^{2+} , otra función de las mitocondrias es la de dirigir la muerte celular, tanto por apoptosis como por necrosis. La diferencia entre ambos tipos de muerte radica en que en la apoptosis la integridad de la membrana plasmática se mantiene hasta que los cuerpos apoptóticos son eliminados por fagocitosis, mientras que en la necrosis se rompe la membrana, hecho que resulta en un proceso inflamatorio debido a la liberación de factores inflamatorios albergados en el citoplasma (Ankarcrona et al. 1995). Estos dos mecanismos de muerte celular pueden ser iniciados directamente por las mitocondrias o mediante receptores de superficie celular, aunque en este último caso las mitocondrias también forman parte de manera activa en el proceso (Danial & Korsmeyer 2004). El evento desencadenante de la apoptosis es el reclutamiento, activación y permeabilización de la MME por proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak, lo cual permite que proteínas mitocondriales apoptóticas como el citocromo c o SMAC/DIABLO se liberen al citosol

(Orrenius 2004). Estas proteínas mitocondriales realizan otras funciones cuando se encuentran las mitocondrias, como por ejemplo el citocromo c, que participa en la cadena de transporte de electrones, pero cuando son liberadas al citosol, promueven vías de muerte celular (Danial & Korsmeyer 2004). Por otro lado, el evento desencadenante de la necrosis es la apertura sostenida de los PTPm, hecho que provoca la rápida disipación del MMP y por lo tanto, la detención abrupta de la síntesis de ATP (Leist et al. 1997), con las nefastas consecuencias que eso comporta para la célula.

Generación de especies reactivas de oxígeno

Por otro lado, durante el transporte de electrones se genera una pérdida esporádica de electrones que da lugar a generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que las mitocondrias son una de las principales fuentes de ROS en la célula, aunque también poseen mecanismos antioxidantes para eliminarlos (Zhao et al. 2019). A bajos niveles, las ROS actúan como moléculas de señalización en procesos que son cruciales para una óptima respuesta frente a estímulos fisiológicos y patológicos, pero a altos niveles pueden inducir a daños importantes e irreversibles para las mitocondrias y células (Sena & Chandel 2012). La formación de ROS se favorece con un alto MMP, aunque también se ha observado que ocurre al despolarizarse el MMP o si el flujo de electrones se obstaculiza por alteraciones en los complejos respiratorios de la cadena (Nickel et al. 2014). Esta paradoja se explica con el hecho de que ocurre un deterioro de las capacidades antioxidantes de manera concomitante a las alteraciones en la bioenergética mitocondrial (Aon et al. 2010), tanto cuando incrementa en exceso como cuando decrece.

Señalización

Otra de las funciones destacadas de las mitocondrias es la señalización. Esta función queda patente en otras de las funciones ya comentadas anteriormente, como es el caso de la señalización apoptótica por parte de proteínas mitocondriales como el citocromo c, de las vías de señalización en las cuales actúan las ROS, o en el transporte de calcio, el cual participa como mensajero en procesos de intercambio de información entre las mitocondrias y diferentes estructuras celulares, como será comentado más

adelante (ver sección 3.2.), entre otras. No obstante, las mitocondrias también actúan como señalizadoras en otros muchos procesos, entre los cuales destacan las respuestas en el sistema inmunitario durante una infección (Arnoult et al. 2011), frente al estrés mitocondrial por proteínas dañadas y mal plegadas (UPRmt) (Bohovych & Khalimonchuk 2016) o el proceso de señalización retrógrada mitocondrial (Liu & Butow 2006), en los cuales se transmiten una serie de señales que dan lugar a cambios en la expresión de genes nucleares, con el fin de adaptar la célula a condiciones comprometidas o patológicas.

Síntesis del grupo hemo

El grupo hemo es una metalo-porfirina constituida por un ion ferroso que se encuentra presente en todos los compartimentos subcelulares y que contribuye de manera vital en gran cantidad de funciones de la célula eucariota (Swenson et al. 2020). Este metalo-cofactor es esencial actuando como lanzadera de electrones entre proteínas, por ejemplo en la respiración mitocondrial, transportando y almacenando oxígeno, por ejemplo en las globinas, como catalizador en distintas reacción químicas o como molécula señalizadora (Poulos 2014). No obstante, tiene carácter citotóxico, por lo que las células deben regular de manera muy precisa su síntesis y degradación para moderar su biodisponibilidad (Kumar & Bandyopadhyay 2005). Su síntesis se realiza a partir de glicina y consta de casi una decena de reacciones bioquímicas. Las primeras y últimas de ellas tienen lugar en la mitocondria, algunas en la matriz y otras en el espacio intermembrana, y las intermedias en el citosol. No obstante, actualmente aún se desconoce el mecanismo de transporte de la glicina y los productos intermedios a través de las membranas mitocondriales (Swenson et al. 2020).

Dado la gran cantidad de funciones que realizan las mitocondrias, su importancia y la relación funcional que existe entre ellas, parece lógico que un estado de disfunción mitocondrial sea el nexo común entre infinidad de patologías muy heterogéneas entre sí, como los procesos neurodegenerativos (Zorzano & Claret 2015; Byvaltsev et al. 2010), cáncer (Książakowska-Łakoma et al. 2014), diabetes (Sivitz & Yorek 2010) o enfermedades cardiovasculares (Murphy et al. 2016), y que se postule como una potencial diana terapéutica común. Aunque a su vez, la complejidad de sus propias

funciones, junto con la participación de otros orgánulos y vías celulares con las cuales comparte funciones, conforma un entramado difícil de abordar en conjunto, por lo que el enfoque de su estudio debe realizarse parte por parte.

3. Contactos mitocondria – retículo endoplasmático

La identidad de los orgánulos celulares viene determinada por las proteínas que albergan y las funciones específicas que cada uno de ellos pueden llevar a cabo, no obstante, no funcionan como estructuras completamente aisladas. Es por eso que la existencia de lugares de contacto entre distintos orgánulos proporciona la conformación de dominios altamente especializados que desempeñan funciones sinérgicas adicionales muy importantes, y que sin los cuales las células verían comprometido su estado fisiológico (Rowland & Voeltz 2012).

3.1. Membranas del retículo endoplasmático asociadas a mitocondrias

Los lugares de contacto establecidos entre mitocondrias y retículo endoplasmático son probablemente los contactos entre orgánulos más estudiados durante estos últimos años, debido a sus importantes funciones para la célula y su potencial implicación en distintas patologías. Estos contactos se definen como regiones de las membranas de los dos orgánulos que están posicionadas de manera yuxtapuesta pero sin que se lleguen a fusionar, y por tanto, manteniendo sus identidades (Rowland & Voeltz 2012).

Las zonas del RE que están en contacto con las mitocondrias se denominan membranas asociadas a mitocondrias (MAMs), y se han identificado en todos los organismos eucariotas, desde levaduras hasta humanos (Vance 2014). Estas zonas contienen un proteoma especial, tanto en la superficie de las membranas como en las regiones del lumen cercanas a ellas, y una composición de lípidos distinta al resto de las membranas del RE, lo cual se debe a las funciones específicas que desempeñan (Raturi & Simmen 2013). Desde hace años, el término MAM no solo define la zona de la membrana del RE que toma contacto con la mitocondria sino que se ha extrapolado como referencia al contacto físico-funcional entre ambos orgánulos y a la composición bioquímica que lo define (Giacomello & Pellegrini 2016).

En varios estudios se ha demostrado experimentalmente que estos contactos pueden ser regulados por la célula según sus necesidades metabólicas (Sood et al. 2014) o frente estímulos patológicos como son el estrés del RE (Bravo et al. 2011) o la apoptosis (Csordás et al. 2006), concretamente, en el número de contactos, el tamaño del área de contacto y la distancia entre orgánulos. Este hecho indica que las MAMs son elementos dinámicos cuya organización estructural está integrada en una regulación clave de procesos celulares y metabólicos fundamentales. No obstante, también constituyen unas estructuras estables, ya que los dos orgánulos pueden moverse a través del citoesqueleto manteniendo el contacto (Friedman et al. 2010). Es por este motivo que es difícil dar valores exactos y universales en referencia a las MAMs, pero se estima que alrededor de un 5-20% de la superficie mitocondrial está en contacto con el RE, pudiendo generar una misma mitocondria múltiples contactos distintos con el RE (Fig.7) (Krols et al. 2016). Todavía se desconoce si los distintos tipos celulares están caracterizados por unos parámetros característicos en sus MAMs, pero el hecho de que distintos tipos celulares tengan una dinámica tanto reticular como mitocondrial característica en función de sus requerimientos fisiológicos, induce a pensar que pueda ser así.

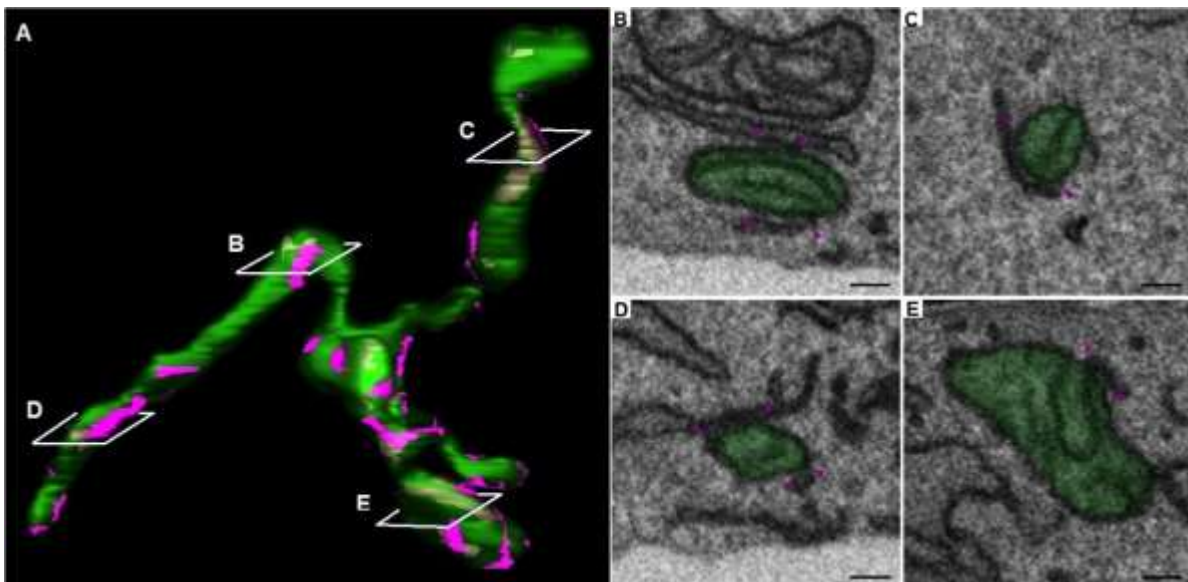


Figura 7. Reconstrucción en 3D de la morfología (A) de los contactos RE-mitocondria (violeta) en las mitocondrias (verde) a partir de imágenes (B-E) tomadas mediante un microscopio electrónico de haz de iones enfocado (FIB-SEM). Imagen modificada de (Krols et al. 2016).

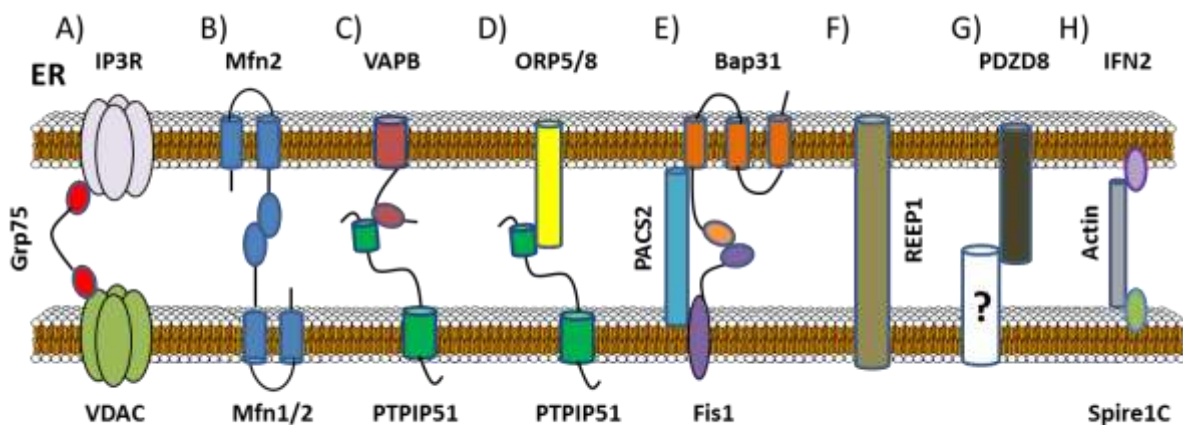
Aunque los túbulos que conforman el RE liso son la parte más dinámica de la red reticular y establecen MAMs, también se encuentran MAMs en el RE rugoso (P. Wang et al. 2015). No obstante, existen diferencias entre ambas, ya que las formadas en el RE liso, de entre 10-50nm, tienen comúnmente una distancia más próxima entre membranas que las formadas en el RE rugoso, de entre 50-80nm. Además, diferentes estudios indican que la proximidad del contacto determina la función del mismo, siendo ciertas distancias más favorables para llevar a cabo ciertas funciones (Giacomello & Pellegrini 2016), hecho que concuerda con las distintas funciones que realizan también el RE liso y rugoso.

Mediante microscopia electrónica de barrido se ha podido observar la presencia de áreas electron-densas en la hendidura de los contactos, las cuales corresponden a complejos especializados que unen ambos orgánulos (Csordás et al. 2006). La existencia de estos complejos permite que ambas membranas recorran a lo largo cientos de nanómetros paralelamente separadas por unos pocos nanómetros, haciendo posible la composición de estas estructuras tan bien organizadas. Además, en ese mismo estudio se demostró también que la naturaleza de estos complejos es proteica, ya que se obtuvo una fracción mitocondrial y se sometió a una digestión proteolítica parcial con tripsina o proteinasa K, permitiendo separar las MAMs tras el proceso (Csordás et al. 2006). El hecho de que los contactos varíen en rangos desde 10 a 80 nm sugiere que existen diferentes tipos de complejos enlazadores, ya que si no debería existir una molécula enlazadora universal, la cual aún no se ha descubierto, y porque regular cambios dinámicos de distancias tan grandes en un solo mecanismo sería un gasto de energía excesivo para célula (Giacomello & Pellegrini 2016). Este mecanismo sí que está bien caracterizado en levaduras, en las cuales se describió como enlazador un complejo formado por cuatro componentes, llamado ERMES (Rowland & Voeltz 2012). No obstante, no se ha identificado el homólogo de ERMES en eucariotas superiores, así que aunque las MAMs fueron descubiertas originalmente en células de mamíferos, sus complejos enlazadores no están aún bien caracterizados. Además, la mayor complejidad de funciones que realizan las MAMs en los eucariotas superiores respecto a levaduras, indicaría también una mayor complejidad en los enlazadores que forman parte en las mismas (Herrera-Cruz & Simmen 2017). Es por

eso, que estos últimos años se han propuesto y descrito distintos complejos proteicos, no solo como potenciales enlazadores físicos, sino también funcionales (Fig.8).

Seguramente, uno de los más conocidos, y de especial interés en este presente trabajo, sea el complejo funcional VDAC-IP3R-Grp75 (Fig.8A), el cual se encarga del transporte de Ca^{2+} desde el RE hacia las mitocondrias (Szabadkai et al. 2006) (para una explicación más detallada de la implicación de este complejo en las MAMs, ver sección 3.2.). Por otro lado, también son de especial interés en este trabajo las mitofusinas (Fig.8B), las cuales están ampliamente aceptadas como reguladoras de los contactos. Aunque inicialmente se propuso que ayudan al acercamiento de ambos orgánulos (de Brito & Scorrano 2008), y hay evidencias de este hecho en diferentes estudios (Hailey et al. 2010; Area-Gomez et al. 2012; Sugiura et al. 2013; Naon et al. 2016; Basso et al. 2018), también se han mostrado evidencias que indican que promueven su distanciamiento (Cosson et al. 2012; Filadi et al. 2015; Leal et al. 2016), por lo que es un tema que aún está en debate (para una explicación más detallada del papel de las mitofusinas en las MAMs, ver sección 4.2.). No obstante, hay otros complejos que se han descrito más recientemente y que también parecen jugar un papel importante en todo este entramado. Por ejemplo, el complejo formado por las proteínas VAPB (proteína integral de la membrana del RE involucrada en el UPR) y PTPIP51 (proteína de la MME) (Fig.8C), el cual se ha demostrado que su sobreexpresión aumenta, mientras que su silenciamiento disminuye, los contactos RE-mitocondria, de manera concomitante con cambios a nivel funcional como alteraciones en el intercambio de Ca^{2+} (Stoica et al. 2014) o en la autofagia (Gomez-Suaga et al. 2017). PTPIP51, además, también ha sido descrita como proteína enlazadora junto con ORP5/8 (Fig.8D), las cuales se encuentran en el RE y facilitan el transporte de fosfatidilserina del RE a la membrana plasmática (Von Filseck et al. 2015; Chung et al. 2015). La localización de estas proteínas del RE en las MAMs recae justamente en su interacción con PTPIP51, y el silenciamiento de las mismas provoca alteraciones en la morfología mitocondrial y la respiración mitocondrial (Galmes et al. 2016). Recientemente, se ha demostrado una implicación aún mayor de estas proteínas del RE en las mitocondrias, y es que se ha descrito que transportan fosfatidilserina a las mitocondrias a través de las MAMs y, además, regulan su captación de Ca^{2+} mediante el canal VDAC (Rochin et al. 2019). Por

otro lado, existe el complejo formado por las proteínas Bap31 (chaperona integral de membrana del RE) y Fis1 (proteína de fisión mitocondrial) (Fig.8E), el cual se cree que podría establecer un papel relacionado con la apoptosis (Iwasawa et al. 2011). Además, el producto de Bap31 generado tras su digestión por la caspasa-8, aumenta la captación de Ca^{2+} liberado del RE hacia las mitocondrias (Breckenridge et al. 2003; Chandra et al. 2004), por lo que también es un enlace de carácter funcional (Liu & Zhu 2017). La interacción entre las dos proteínas de este complejo estaría modulada por la proteína PACS-2, tal como se demuestra cuando se elimina la expresión de PACS-2, la cual causa un desacoplamiento de los contactos RE-mitocondrias y alteración de transferencia de Ca^{2+} , de manera dependiente de Bap-31 (Simmen et al. 2005). Otro enlazador sería la proteína REEP1 (Fig.8F), la cual localiza en las MAMs. Esta proteína está ligada a la paraplejia espástica hereditaria y a algunas alteraciones hereditarias de neuronas motoras, y se ha demostrado que influye los contactos RE-mitocondrias,



Mitochondria

Figura 8. Imagen representativa de los distintos complejos proteicos enlazadores físicos y funcionales entre mitocondrias y retículo endoplasmático: IP₃R-Grp75-VDAC (A), Mfn2-Mfn2/Mfn1 (B), VAPB-PTPIP51 (C), ORP5/8-PTPIP51 (D), Bap31-Fis1 (E), REEP1 (F), PDZD8-¿? (G) e INF2-Spire1C (H).

ya que mutaciones en esta proteína asociadas con dichas enfermedades tienen como consecuencia una disminución en los contactos entre ambos orgánulos (Lim et al. 2015). Además, eliminando la expresión de esta proteína se observan mayores niveles de estrés en el RE, hecho que conlleva a una mayor degeneración axonal (Wang et al. 2020). También existen evidencias que la proteína PDZD8 (Fig.8G), localizada en el RE, estaría actuando de enlazadora de ambos orgánulos. Esta proteína contiene un dominio ortólogo funcional y estructural de uno de los componentes del complejo de

levaduras ERMES, y se encuentra también en las MAMs (Hirabayashi et al. 2017). La eliminación de dicha proteína tiene un efecto negativo en el mantenimiento de los contactos RE-mitocondrias, tanto en superficie como en distancia, así como en la transferencia de Ca^{2+} desde el RE hacia las mitocondrias (Hirabayashi et al. 2017). Además, en un modelo de *Drosophila* de enfermedad de Alzheimer, la disminución de la expresión de PDZD8 y consiguiente disminución de los contactos se traduce en un aumento en la mitofagia, hecho que resulta como un mecanismo protector frente a la enfermedad como consecuencia del mantenimiento de una red mitocondrial más saludable (Hewitt et al. 2020). No obstante, no se sabe aún con qué proteína mitocondrial interacciona o si actúa como enlace mediante un mecanismo distinto. Finalmente, las proteínas IFN2 (RE) y Spire1C (mitocondrias) (Fig.8H) también permiten una mayor proximidad en ambos orgánulos a través de su unión a actina y posterior ensamblaje en las MAMs. Concretamente esto sucede durante el proceso de fisión mitocondrial en el cual, gracias a estos enlaces, el RE envuelve a las mitocondrias y las constriñe, marcando los puntos de división mitocondrial donde se reclutará Drp1 (Manor et al. 2015). La polimerización de la actina en estas zonas no solo permite una mayor unión física, sino también un aumento en la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias, lo cual activa la constricción de la MMI de manera independiente a Drp1 (Chakrabarti et al. 2017). Estas dos proteínas, no solo interactúan mediante actina, sino que también interaccionan de manera directa para regular la fisión mitocondrial (Manor et al. 2015). Paralelamente, también se ha sugerido que las MAMs establecidas en el RE rugoso, al ser las que albergan mayor distancia entre membranas, también tienen un mecanismo de unión distinto (P. Wang et al. 2015).

Estos complejos descritos, además de regular las MAMs, también pueden ser regulados a su vez por otras proteínas mediante interacciones, degradación, fosforilaciones u otras modificaciones, o incluso entre ellos mismos (Simmen et al. 2005; Basso et al. 2018; Stoica et al. 2016; Paillusson et al. 2016; Rochin et al. 2019), hecho que denota la complejidad y los muchos recursos de los que dispone la célula para regular las MAMs de manera precisa según sus necesidades.

3.2. Comunicación mediante Ca^{2+}

Una de las funciones más importantes de las MAMs, debido a su rol central en la fisiología y funcionalidad de estos dominios especializados, es la comunicación entre orgánulos mediante Ca^{2+} , la cual es objeto de estudio en este trabajo. De hecho, fue una de las primeras relaciones funcionales que se observó entre ambos orgánulos, cuando se demostró la existencia de pequeñas acumulaciones de Ca^{2+} liberado del RE en puntos concretos próximos a las mitocondrias (Rizzuto et al. 1998; Csordas et al. 1999). Dado que desde hace años también se conoce que la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria potencia su metabolismo y bioenergética (Denton et al. 1980; Hansford & Zorov 1998), desde entonces múltiples estudios se han dirigido a confirmar y entender cómo esta comunicación mediante Ca^{2+} permite activar y regular el metabolismo mitocondrial (Cárdenas et al. 2010; Anelli et al. 2012; Carreras-Sureda et al. 2017b; Marchi et al. 2018).

Del mismo modo que fue uno de los primeros procesos funcionales descubierto en las MAMs, el primer complejo proteico que se observó como puente entre ambos orgánulos también estaba relacionado con la comunicación de Ca^{2+} . Este complejo está formado por tres proteínas, VDAC (canal situado en la MME), IP_3R (canal transportador de Ca^{2+} situado en el RE) y Grp75, una proteína que interacciona con ambos receptores, permitiendo la formación del complejo (Fig.8 A) (Szabadkai et al. 2006). El silenciamiento de Grp75 produce una disminución en la transferencia de Ca^{2+} del RE a la mitocondria, pero no afecta a la distancia física entre ambos (Szabadkai et al. 2006), del mismo modo que sucede eliminando la expresión de IP_3R (Csordás et al. 2006). Por lo tanto, este complejo no representa un enlazador físico entre ambos orgánulos, sino uno funcional, el cual permite que los canales de transporte de Ca^{2+} de ambos orgánulos se sitúen de manera contigua y se optimice la transferencia del mismo. De hecho, ambos canales se encuentran de manera más abundante en las MAMs que en el resto de orgánulo, facilitando la formación del complejo y formando parte del proteoma especializado de estas zonas (Raturi & Simmen 2013), hecho que denota aún más la importancia de esta función para la viabilidad celular.

La comunicación de Ca^{2+} entre ambos orgánulos no es un mecanismo unidireccional, sino un proceso cíclico. Este proceso se inicia con la producción de IP_3 , el cual se une a sus receptores (IP_3R) y se libera Ca^{2+} a través de los mismos, creando micro-dominios con mayor concentración de Ca^{2+} (Rizzuto et al. 1998). Como en estas zonas las mitocondrias están contiguas al RE, el Ca^{2+} es rápidamente captado por la mitocondria, el cual atraviesa la MME mediante los canales VDAC y la MMI mediante los canales MCU. Los canales MCU captan Ca^{2+} sin necesidad de estar próximos al RE y presentan baja afinidad por el mismo (Marchi & Pinton 2014), pero gracias a los micro-dominios de alta concentración de Ca^{2+} generados por la liberación del mismo desde el RE, su captación se favorece y se realiza de manera eficiente y regulada (Fig.9) (Giacomello et al. 2010). Por su parte, el Ca^{2+} mitocondrial se libera a través de canales intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCLX) (Palty et al. 2010) y éste vuelve a ser captado eficientemente por las ATPasas SERCA hacia el lumen del RE (Verkhatsky & Shmigol 1996), cerrando de este modo el proceso. De esta forma, las mitocondrias no solo captan y liberan Ca^{2+} para regular su estado bioenergético, sino que contribuyen junto con el RE a la homeostasis del Ca^{2+} celular, actuando como mensajero tanto en

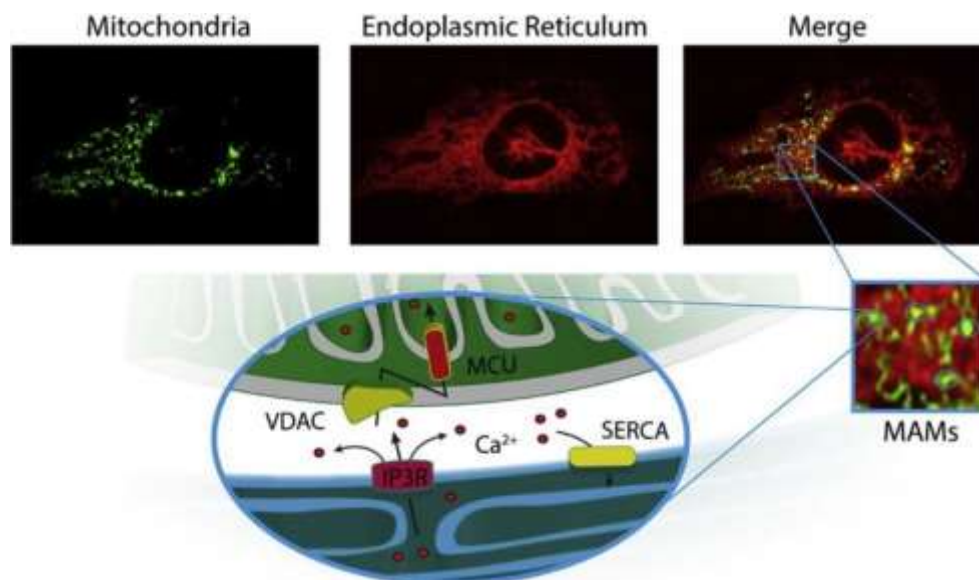


Figura 9. Mecanismo de transporte de Ca^{2+} mediante el cual el Ca^{2+} almacenado en el RE es liberado y captado por las mitocondrias de manera más eficiente gracias al establecimiento de MAMs. Imagen de (Marchi et al. 2018).

procesos fisiológicos como patológicos fundamentales para las células, como es el proceso de apoptosis. Tal y como ya se ha comentado anteriormente, sobre todo en

células excitatorias como las neuronas (Lanner et al. 2010), y en menor medida en fibroblastos (Ruas et al. 2015; Augusto et al. 2020), los canales RyR también permiten la salida de Ca^{2+} desde el RE de manera inducida por el propio Ca^{2+} (Verkhatsky & Shmigol 1996).

El paso del Ca^{2+} a través de las membranas lipídicas mediante canales puede ser realizado por transporte activo o pasivo. En el caso de las MAMs, el transporte de Ca^{2+} desde el RE hasta el MCU se lleva cabo por transporte pasivo, es decir, mediante un proceso de difusión a coste zero, el cual permite el movimiento de iones y moléculas en distancias cortas. Por lo tanto, el transporte de Ca^{2+} se rige por leyes físicas de difusión de Fick y Einstein (Giacomello & Pellegrini 2016), las cuales determinan que el Ca^{2+} se mueve de regiones con mayor concentración, como es la membrana del RE al liberarse el Ca^{2+} , a regiones con menor concentración, como es la superficie mitocondrial, formando un gradiente que cambia con el tiempo (Filadi & Pozzan 2015). Teniendo en cuenta esta premisa, mediante la ecuación de difusión de Einstein se predice que doblar el rango de distancia típico de las MAMs ralentiza hasta cuatro veces el tiempo de difusión del Ca^{2+} entre ambas (Giacomello & Pellegrini 2016). Por lo que la distancia entre ambas membranas es determinante en la eficiencia del transporte de Ca^{2+} (Fig.10). No obstante, en la práctica esta teoría no es aplicable de manera universal, ya que por ejemplo reducir la distancia de manera artificial de 15nm hasta 7nm, disminuye hasta en un 80% la captación de Ca^{2+} (Csordás et al. 2010). Teniendo en cuenta que se estima que el canal IP_3R , el cual libera el Ca^{2+} del RE, sobresale unos 10nm (Jiang et al. 2002), la explicación radica en que una distancia menor a su propio tamaño hace imposible el establecimiento del complejo $\text{IP}_3\text{R-VDAC-Grp75}$ (Fig.10A). Además, dado que el complejo abarca como máximo un espacio de unos 25nm (Szabadkai et al. 2006), se puede deducir que una distancia mayor no permitiría la formación del mismo y se comprometería la transferencia de Ca^{2+} (Fig.10B). Así pues, un transporte eficiente de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias se lleva a cabo cuando ambas membranas se encuentran entre 12-24nm, y un acercamiento o distanciamiento de las mismas fuera de estos rangos afecta de manera negativa la transferencia de Ca^{2+} (Giacomello & Pellegrini 2016). De igual manera, debido a las leyes físicas de la difusión, cambios de distancia dentro del rango establecido como

óptimo también tienen un efecto en la captación de Ca^{2+} (Fig.10C), hecho que podría ser utilizado por la propia célula como mecanismo para controlar la bioenergética mitocondrial frente a cambios metabólicos o fisiológicos (Cárdenas et al. 2010; Cali et al. 2013). Por lo tanto, la distancia entre membranas en las MAMs no solo determina las funciones en sí que pueden realizar, sino que también las regula de manera precisa (Giacomello & Pellegrini 2016).

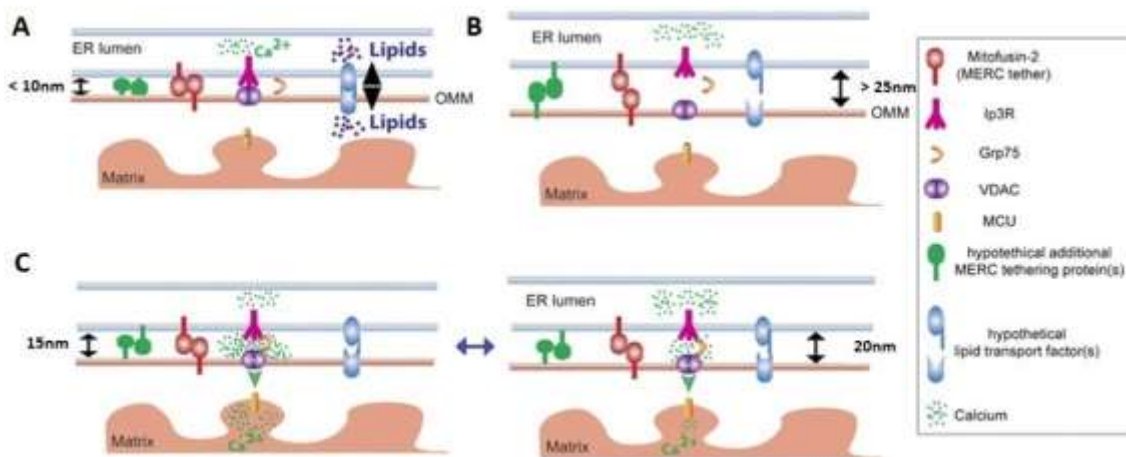


Figura 10. Imágenes representativas de distintas situaciones de los contactos mitocondria-RE según la distancia de los mismos. Se representan las mitofusinas y otras proteínas adicionales como hipotéticos enlazadores físicos que facilitan el proceso. Imagen modificada de (Giacomello & Pellegrini 2016).

3.3. Otras funciones de las MAMs

Las MAMs realizan multitud de funciones distintas, entre las cuales no solo destaca la, ya comentada, homeóstasis del Ca^{2+} , sino también la síntesis y transporte de lípidos, la regulación de la fisión mitocondrial y la regulación de la apoptosis y autofagia, entre otras.

Síntesis y transporte de lípidos

Las MAMs fueron identificadas originalmente como una fracción de la membrana del RE altamente enriquecida en fosfatidilserina sintasa 1 y 2 (Pss1 y Pss2) (Vance 1990), y la primera relación funcional descrita entre ambos orgánulos fue la transferencia de fosfolípidos (Vance 1991). A diferencia del RE, otros orgánulos, incluyendo las mitocondrias, no poseen la capacidad de sintetizar fosfolípidos *de novo*, y dependen del RE como su única fuente (Voeltz et al. 2002). Aunque la mayor parte de la síntesis

de lípidos de membrana se lleva a cabo en el RE, enzimas requeridas para la síntesis de ciertos fosfolípidos se encuentran en las mitocondrias. De hecho, la biosíntesis de dos de los fosfolípidos más abundantes de la célula, como son fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), se realiza en las MAMs (van Meer et al. 2008) por este motivo (Fig.11 A). En este proceso, se sintetiza fosfatidilserina mediante las Pss1 y Pss2 del RE de manera dependiente de Ca^{2+} (Vance & Steenbergen 2005), la cual se transfiere a las mitocondrias para convertirla en PE por enzimas albergadas en ellas, suministrando de esta forma a las mitocondrias con fosfolípidos, los cuales son necesarios para mantener la integridad de sus membranas. Para generar PC, la PE es transferida de nuevo al RE, donde se encuentran las enzimas necesarias para la reacción (Osman et al. 2011). Además de fosfolípidos, hay estudios que han demostrado que en las MAMs también se sintetizan triacilgliceroles y la conversión de colesterol en hormonas esteroideas (Vance 2014). Aún no se sabe exactamente como se transportan los lípidos entre ambas membranas, aunque se ha propuesto un modelo que parece tener bastante aceptación debido a su componente no solo bioquímica sino también física. En este modelo, los lípidos se recubrirían con proteínas transportadoras y difundirían entre las dos membranas sujetos a las leyes físicas de Fick y Einstein, del mismo modo que en el transporte de Ca^{2+} . Además, como el mecanismo molecular implica el transporte de grandes moléculas hidrofóbicas y mediante microscopia electrónica se ha observado la existencia de MAMs de 10nm, se cree que esta distancia sería la distancia entre membranas idónea para el transporte de lípidos (Fig.10A) (Giacomello & Pellegrini 2016).

Regulación de la fisión mitocondrial

Por lo que hace a la dinámica mitocondrial, se requiere un recubrimiento de la mitocondria en forma de gancho por parte de los túbulos del RE liso para generar un primer paso de pre-estrechamiento en la mitocondria e iniciar el proceso de fisión (Fig.11 B). Este recubrimiento ayuda físicamente ya que disminuye el diámetro de las mitocondrias de 300-500 nm hasta aproximadamente 150 nm, permitiendo a la proteína Drp1 formar su anillo de estrechamiento y marcarlo como lugar de escisión (Friedman et al. 2011). Además, gracias a la formación de las MAMs, dos proteínas nucleadoras de actina como son IFN2 (del RE) y Spire1C (de la mitocondria) actúan de

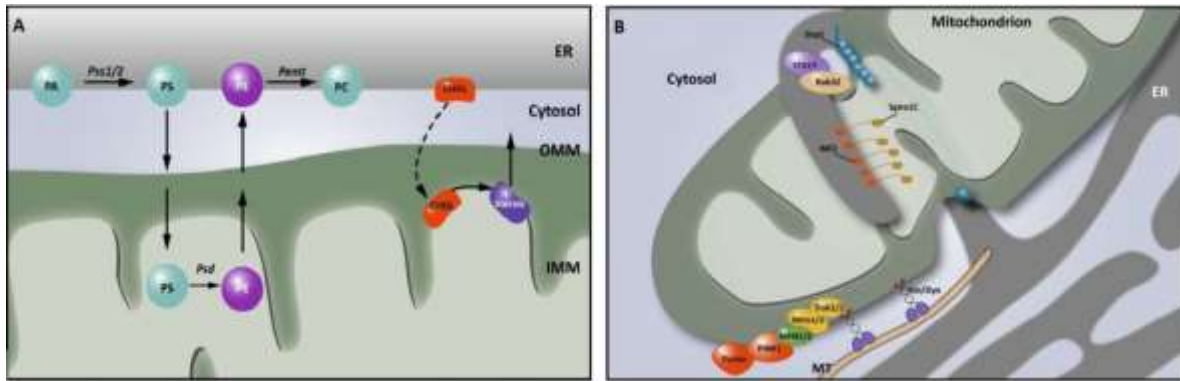


Figura 11. Imágenes representativas de los procesos de síntesis de lípidos (A) y fisión mitocondrial (B), los cuales se llevan a cabo en las MAMs. Imágenes modificadas de (Krols et al. 2016).

manera coordinada para ensamblar los filamentos de actina necesarios para el estrechamiento de la mitocondria en el lugar de escisión (Manor et al. 2015). Aunque no está del todo claro como el RE escoge y marca los lugares para la división mitocondrial, parece que el proceso de replicación de ADN mitocondrial está asociado espacialmente con ello, permitiendo de esta forma la distribución del ADN mitocondrial a las dos nuevas mitocondrias generadas (Lewis et al. 2016).

Regulación de la apoptosis y autofagia

A parte de las funciones ya mencionadas, muchos otros estudios centrados en las MAMs han revelado otras múltiples funciones adicionales, no menos importantes para la célula. Estas funciones generalmente no actúan de manera individual, sino que están estrechamente relacionadas con otras o derivan de ellas. Por ejemplo, dado que en las MAMs se generan micro-dominios de alta concentración de Ca^{2+} , si éste es captado en exceso por la mitocondria, desencadenará un proceso apoptótico (Romero-Garcia & Prado-Garcia 2019), por lo que ambos procesos están ligados. Hay estudios que muestran mecanismos alternativos mediante los cuales la célula regula específicamente la función apoptótica en las MAMs (Bonneau et al. 2016; Iwasawa et al. 2011) o mecanismos que utilizan procesos aquí descritos, como la dinámica mitocondrial (Prudent et al. 2015). Otro ejemplo es el del estrés del RE, donde inicialmente el RE requiere gran cantidad de ATP para satisfacer las demandas de la gran cantidad de chaperonas que se han producido para superar la situación comprometida. Como el ATP se produce en las mitocondrias, ambos orgánulos cooperan funcionalmente y se observa un aumento de los contactos entre ambos de

manera concomitante a un aumento en la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria y de su bioenergética (tanto MMP, como consumo de oxígeno y producción de ATP) (Bravo et al. 2011; Bravo et al. 2012). Además, se ha demostrado también ampliamente que las MAMs se establecen como lugares clave para las respuestas de inflamación (Missiroli et al. 2018) y autofagia (Gomez-Suaga et al. 2017), e incluso se ha observado y sugerido que debido a sus requerimientos espaciales, las MAMs especializadas en funciones autofágicas deben tener una distancia típica de aproximadamente 50 nm (Hamasaki et al. 2013).

Paralelamente con el aumento de procesos y funciones en los cuales se ha observado estos últimos años que las MAMs parecen intervenir, también se ha incrementado la lista de enfermedades asociadas con estos dominios especializados, estando relacionada su alteración con patologías tan diversas como cáncer (van Vliet et al. 2014; Morciano et al. 2018), trastornos metabólicos (Wiley et al. 2013), diabetes (Tubbs et al. 2014), obesidad (Arruda et al. 2014), infecciones virales (Horner et al. 2011) o enfermedades neurodegenerativas como Parkinson (Sironi et al. 2020), Alzheimer (Area-Gomez et al. 2012), de tipo axonal (Hübner & Kurth 2014) o neuromuscular (Bernard-Marissal et al. 2015; Krols et al. 2016). Así pues, aunque las MAMs conforman un complejo entramado de funciones y mecanismos de regulación muy precisos, el estudio de alguna de sus funciones con un rol central, como es el caso del transporte de Ca^{2+} , supone una estrategia terapéutica de gran potencial e interés.

4. Las Mitofusinas 1 y 2

4.1. Estructura, dominios y mecanismos de interacción de las Mitofusinas

Mientras que la dinámica mitocondrial se ha observado en distintos organismos desde el inicio del siglo XX (Lewis & Lewis 1915), la maquinaria que lleva a cabo este proceso no se descubrió hasta finales del mismo, concretamente en *Drosophila* (Hales & Fuller 1997). La proteína Fzo fue descubierta en el proceso de espermatogénesis, ya que mutaciones en la misma producían alteraciones en la fusión mitocondrial, y como consecuencia, esterilidad en machos (Hales & Fuller 1997). No fue hasta unos pocos

años más tarde que en mamíferos, sus proteínas homólogas Mitofusina1 y Mitofusina 2 (Mfn1 y Mfn2) fueron identificadas (Santel & Fuller 2001; Rojo et al. 2002; Bach et al. 2003), dando paso a consiguientes estudios que han aportado un mejor entendimiento de su función estructural así como la identificación del resto de proteínas de dinámica mitocondrial. Cabe destacar que, paralelamente, en *Drosophila* también se descubrió una segunda proteína homóloga de las mitofusinas, llamada dmfn, y que su expresión no era específica de la línea germinal masculina, a diferencia de Fzo, sino que se encontraba en machos y hembras adultos, en ambas líneas germinales y en embriones (Hwa et al. 2002).

Tal como se ha comentado, hoy en día se sabe que las mitofusinas son unas proteínas que forman parte de la familia de las dinaminas y se encuentran en la membrana mitocondrial externa, pudiéndose encontrar también una pequeña fracción de Mfn2 en la membrana del RE (de Brito & Scorrano 2008). La secuencia primaria de las mitofusinas, del mismo modo que sus proteínas homólogas en *Drosophila* y levadura, se caracteriza por la presencia de una serie de dominios conservados en las distintas especies. Estos dominios consisten en una GTPasa N-terminal seguida de un dominio HR1 (en forma de hélice superenrollada), una región transmembrana y un dominio HR2 C-terminal (también en forma de hélice superenrollada) (Fig.12) (Chandhok et al. 2018). No obstante, aunque ambas mitofusinas son altamente homólogas (alrededor de 80%), comparten solamente un 63% de identidad, por lo que muestran diferencias, como por ejemplo en el número de aminoácidos que las conforman, siendo de 741 en Mfn1 y 757 en Mfn2 (Zorzano et al. 2010). Estas secuencias de aminoácidos están codificadas en el genoma por 18 exones del cromosoma 3 y 20 exones del cromosoma 1, respectivamente (Schrepfer & Scorrano 2016). Además, Mfn2 posee un dominio de unión a Ras (RBD) en posición N-terminal (Chen et al. 2004) y una región rica en prolinas (PR) entre los dominios HR1 y transmembrana, implicada en interacciones con otras proteínas (Zorzano et al. 2010), de los cuales Mfn1 carece. Al formar parte de la familia de las dinaminas, el dominio GTPasa es el que define la función principal de estas dos proteínas. Este dominio contiene 5 subdominios funcionales, cada uno con una función específica. El G1 une el fosfato del GTP, además de formar junto el G2 y el G3 el centro catalítico. El G3 también se encarga de unir el Mg^{2+} requerido para la

hidrólisis, mientras que el G4 y G5 permiten la conformación específica requerida para la unión del GTP (Bourne et al. 1990; Bourne et al. 1991).

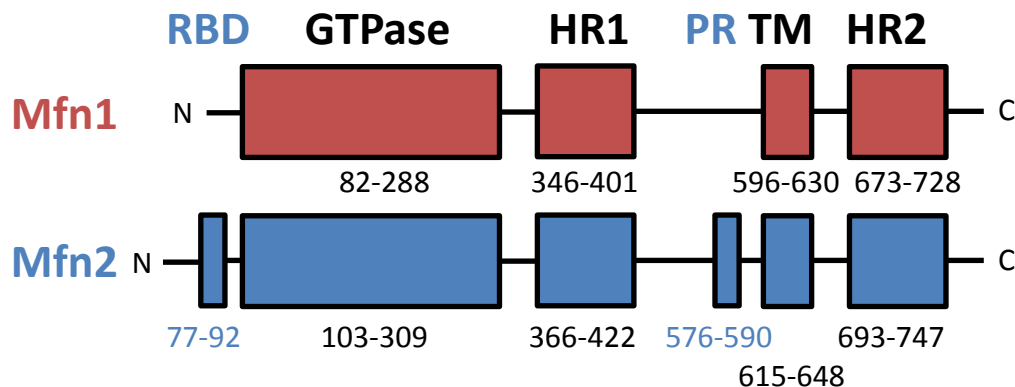


Figura 12. Estructura primaria de las mitofusinas 1 (rojo) y 2 (azul) donde se muestran los distintos dominios y la posición de los aminoácidos que marcan el inicio y final de los mismos. Los nombres y posiciones de los dominios en azul indican que son exclusivos de Mfn2.

La estructura de las mitofusinas, como en todas las proteínas, determina su función primordial, que en su caso es la de permitir primeramente la interacción entre membranas, y luego su acoplamiento y fusión. Estos procesos se inducen mediante auto-oligomerización de las mitofusinas en trans (mitofusinas de distintas membranas), aunque también se da en cis (mitofusinas de la misma membrana), hecho que ayuda a la estabilización de las interacciones en trans (Cohen & Tareste 2018). Mientras que el mecanismo de trans-oligomerización hace años que está descrito y actualmente se han propuesto nuevos mecanismos alternativos, los de cis-oligomerización son igualmente importantes para su propósito funcional y apenas se conoce el mecanismo estructural de manera cierta. Además, el hecho de que las mitofusinas medien tanto las uniones de membrana mitocondria-mitocondria como mitocondria-RE hace surgir una pregunta fundamental: cómo las mitofusinas pueden promover la interacción mitocondria-RE sin fusionar las membranas pero sí lo hacen en la interacción mitocondria-mitocondria. No obstante, desde el principio todos los estudios han estado enfocados en entender primeramente su funcionalidad en mitocondrias, ya que no se conocía su faceta en las MAMs, y ahora que se conoce, se utiliza este conocimiento para extrapolarlo a la interacción RE-mitocondria.

Desde hace años, se ha aceptado un modelo en el cual la topología de las mitofusinas presenta todos los dominios, excepto el transmembrana, encarados hacia el citosol. En

este modelo, la interacción entre mitofusinas se lleva a cabo a través del dominio HR2 (Fig.13A), el cual se encarga de mediar el acercamiento entre las membranas de las mitocondrias que se van a fusionar a través de la formación de dímeros homotípicos (Mfn1-Mfn1 o Mfn2-Mfn2) o heterotípicos (Mfn1-Mfn2). Por su parte, la hidrólisis de GTP por el dominio GTPasa permite finalizar el proceso de acoplamiento de las mitocondrias y fusionar las membranas (Chen et al. 2003; Koshiba et al. 2004). Años más tarde, se ha propuesto un modelo complementario en el cual se muestra la existencia de dos conformaciones funcionalmente distintas, una activa y otra inactiva (Fig.13B), aportando por primera vez evidencias de que la conformación estructural de las mitofusinas está regulada de manera precisa (Huang et al. 2011; Franco et al. 2016). En este modelo, el dominio HR2 puede interactuar con el dominio HR1 de la misma mitofusina, generando una conformación “cerrada” que sería inactiva y no permitiría la interacción con dominios HR2 de otras mitofusinas. Además, según este modelo los dominios GTPasa de mitofusinas de la misma membrana dimerizan para formar oligómeros, constituyendo de este modo estructuras más estables (Fig.13C). No obstante, en estos últimos años se está replanteando el modelo clásico de interacción entre mitofusinas mediante el dominio HR2 debido a la aparición de diferentes estudios que sugieren otros mecanismos. Por ejemplo, dos estudios independientes basados en cristalografía estructural de Mfn1 proponen un nuevo modelo en el cual el dominio GTPasa es el que está involucrado en la interacción entre mitofusinas que precede al acoplamiento y fusión de las membranas (Fig13.D) (Qi et al. 2016; Cao et al. 2017). En ellos se observa que la interacción de las mitofusinas de distintas mitocondrias se da mediante una dimerización de los dominios GTPasa, lo cual activa su actividad GTPasa, y que previniendo esta dimerización se deteriora su capacidad de fusión (Cao et al. 2017). Por otro lado, y en consonancia con estos estudios, otro estudio alternativo ha propuesto un último modelo estructural en el cual el dominio HR2 no se encuentra en el citoplasma, sino en el interior de la mitocondria (Fig.13E) (Mattie et al. 2018), por lo que no podría desempeñar el papel clásico que se le ha otorgado. Además, los dominios HR2 en este caso permiten la formación de oligómeros mediante su interacción, así como interacciones con otras proteínas del espacio intermembrana mitocondrial para mediar su regulación (Fig.13F). A diferencia de este modelo que propone el dominio HR2 en el interior de la mitocondria, el

modelo clásico y el modelo de interacción mediante el dominio GTPasa pueden no ser excluyentes, sino complementarios, si se hipotetiza que la interacción mediada por GTPasa podría ocurrir primero en distancias más largas para acercar ambas membranas y después darse la interacción entre dominios HR2 para estabilizar la interacción, debido a que el dominio HR2 abarca menos distancia (Cohen & Tareste 2018). No obstante, esto es una mera hipótesis sin comprobar experimentalmente, por lo que se debe realizar más investigación en el campo de la interacción estructural entre mitofusinas para dilucidar cuál es el mecanismo real.

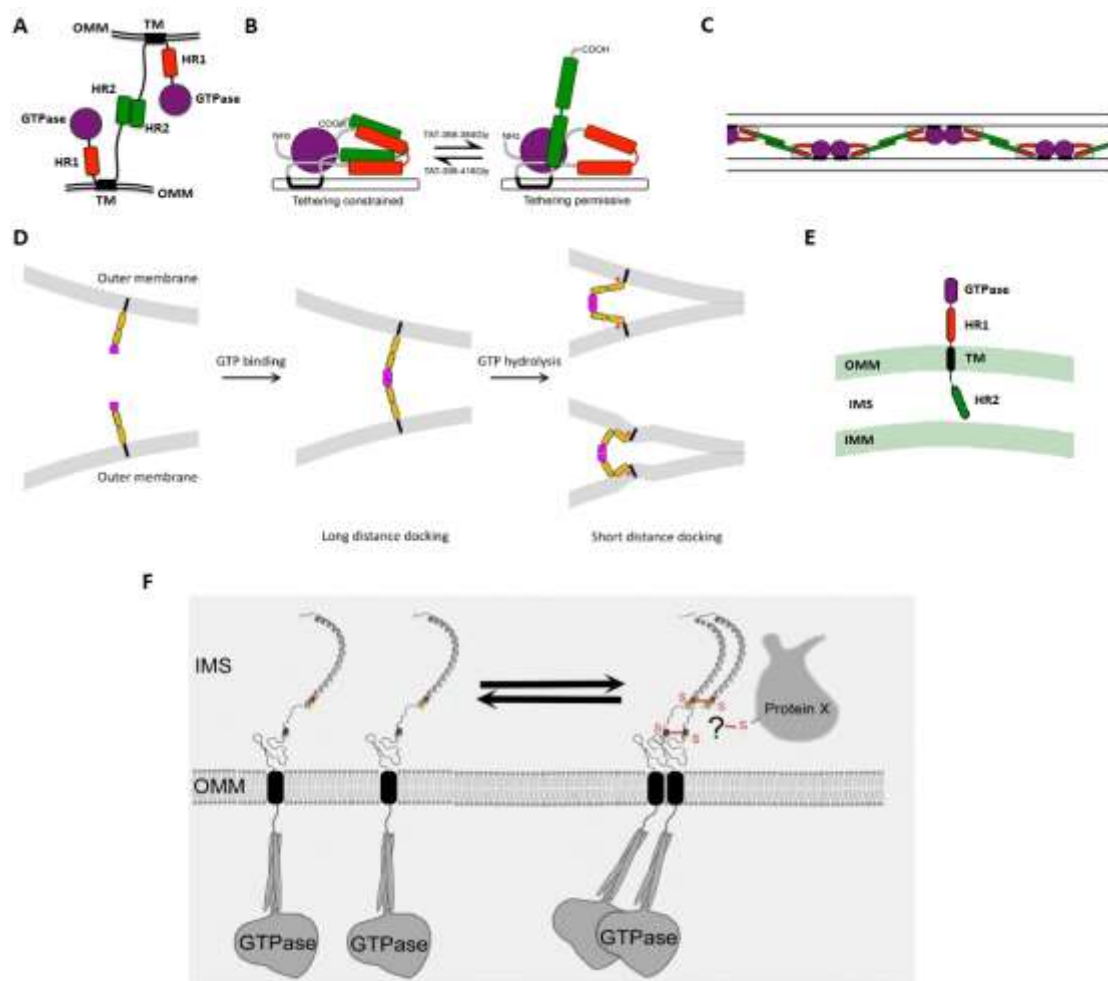


Figura 13. Imágenes representativas de las diferentes topologías e interacciones propuestas para las mitofusinas: Interacción clásica por dominios HR2 (A), regulación de conformación abierta-cerrada mediante interacción entre dominios HR1-HR2 (B), oligomerización en cis mediante dominios GTPasa (C), nueva interacción propuesta por dominios GTPasa (D), nueva topología propuesta con dominio HR2 intermembrana (E) y nueva oligomerización propuesta mediante HR2 intermembrana (F). Imágenes modificadas de (Franco et al. 2016; Cohen & Tareste 2018; Mattie et al. 2018)

Respecto al dominio HR1, se ha demostrado que se requiere para acoplar y fusionar las mitocondrias, es decir, el mecanismo que sigue el acercamiento de las membranas. Concretamente, esta función recae en una hélice anfipática conservada que se encuentra en la zona C-terminal del mismo y se pliega tras interactuar con la superficie de la capa lipídica, lo cual facilita la fusión de las membranas mediante la desestabilización de su estructura (Daste et al. 2018). Por lo tanto, la hidrólisis de GTP generada tras un primer paso de interacción entre mitofusinas, produciría cambios conformacionales que permitiría interactuar a las hélices anfipáticas de los dominios HR1 (Cohen & Tareste 2018). Este mecanismo, compatible tanto con el modelo de interacción por el dominio HR2 como por el de GTPasa, sucede a continuación de los mismos y *a priori* no se llevaría a cabo en la interacción entre membranas mitocondria-RE, donde no hay fusión de las mismas.

4.2. Funciones biológicas de las Mitofusinas

Tal como se ha descrito anteriormente, la función principal y por la cual fueron identificadas estas proteínas es la de fusionar la membrana mitocondrial externa en el proceso de fusión de dos mitocondrias. Esta es una función común en ambas mitofusinas, pero se ha demostrado que Mfn1 presenta una actividad GTPasa ocho veces mayor que Mfn2 y fusiona mitocondrias de manera más eficiente, sugiriendo de esta forma que es la encargada principal de la función de fusión mitocondrial (Ishihara et al. 2004). Además de presentar distinta actividad en una misma función, las mitofusinas no comparten todas las funciones que realizan, sino que llevan a cabo funciones exclusivas aunque sean proteínas homólogas. La primera evidencia de este hecho se demostró en modelos de desarrollo *in vivo*, donde ratones *knockout* para Mfn1 y Mfn2 morían durante la gestación. No obstante, la pérdida de Mfn2 producía un fenotipo más severo y letalidad más temprana que la pérdida de Mfn1 (Chen et al. 2003). Aun así, los embriones doble *knockout* morían incluso antes que los *knockout* simples, por lo que sí que existe una redundancia parcial entre ambas mitofusinas durante la embriogénesis. Otras evidencias son la expresión diferencial de ambas proteínas según el tejido (Eura 2003; Bach et al. 2003; Santel et al. 2003) o que Mfn2, pero no Mfn1, sea esencial para un correcto desarrollo del cerebelo (Chen et al. 2007). A Mfn1 también se le conocen algunas funciones exclusivas que no lleva a cabo Mfn2,

pero suelen estar relacionadas con la dinámica mitocondrial, como es el hecho de promover la actividad de Opa1 durante la fusión de la membrana mitocondrial interna (Cipolat et al. 2004). Por su parte, Mfn2 realiza gran cantidad de funciones alternativas que no realiza Mfn1, probablemente por sus diferencias estructurales, las cuales podrían promover interacciones específicas con proteínas o moduladores de su actividad (Sugiura et al. 2013), así como diferente regulación post-traducciona, aunque es un tema que sigue en estudio.

A diferencia de Mfn1, una pequeña fracción de Mfn2 se encuentra en las MAMs, las membranas del RE que están en contacto con las mitocondrias. Concretamente, alrededor de un 5-10% del total de Mfn2 se atribuye a la membrana del RE y más de un 50% a las de las mitocondrias en la zona MAM (de Brito & Scorrano 2008). Mediante análisis cuantitativos se ha determinado que hay 14 veces más Mfn2 en la zona de las MAMs que en el resto de la mitocondria (de Brito & Scorrano 2008), denotando una mayor importancia de Mfn2 en esta zona que para la fusión mitocondrial. Además, en este mismo estudio se determinó el papel enlazador de Mfn2, la cual promueve un acercamiento entre ambos orgánulos gracias a interacciones homotípicas o heterotípicas con Mfn2 o Mfn1 localizadas en las mitocondrias, respectivamente. Desde entonces, han surgido muchos estudios que han apoyado este modelo (Hailey et al. 2010; Area-Gomez et al. 2012; Sugiura et al. 2013; Naon et al. 2016; Basso et al. 2018). No obstante, también han surgido estudios que defienden la postura contraria, es decir, que Mfn2 separa ambos orgánulos en vez de facilitar su aproximación (Cosson et al. 2012; Filadi et al. 2015; Leal et al. 2016). Por lo que es un tema que aún sigue en debate.

Otra de las funciones fundamentales y exclusivas de Mfn2 es su papel en el metabolismo y bioenergética mitocondrial, hecho que parece lógico dado que hay una mayor expresión de Mfn2 en tejidos con altos requerimientos energéticos, como son el sistema nervioso, el músculo esquelético y el corazón (Bach et al. 2003; Eura 2003). Esta observación, además, se ha demostrado en diferentes estudios de pérdida y ganancia de función. Eliminando la expresión de Mfn2 en diferentes modelos celulares se altera el perfil metabólico celular y la bioenergética mitocondrial, produciendo disminuciones en la oxidación de glucosa, ácidos grasos o piruvato, en el ciclo de

Krebs, el potencial de membrana mitocondrial, la eficiencia de la cadena respiratoria y la expresión de varias subunidades de los complejos de la cadena respiratoria (Bach et al. 2003; Pich et al. 2005; Chen et al. 2005; Mourier et al. 2015). Frente a estos cambios dramáticos en el metabolismo celular, la célula intenta compensarlo captando más glucosa, disminuyendo la síntesis de glicógeno y promoviendo la glicólisis anaeróbica para poder generar ATP. Además, sobreexpresando Mfn2 se observan los efectos contrarios, es decir, un aumento en el metabolismo y bioenergética mitocondrial, todo ello sin alterar la masa mitocondrial (Pich et al. 2005). Un hecho más importante aún si cabe, es que la sobreexpresión de una forma truncada de Mfn2, que no tiene ni dominio transmembrana ni dominio HR2, también aumenta la oxidación de la glucosa y el potencial de membrana mitocondrial. Dado que esta forma truncada no tiene capacidad de fusión mitocondrial porque localiza libremente en el citosol, sugiere que el papel de Mfn2 en el metabolismo es independiente con su capacidad de fusión mitocondrial (Pich et al. 2005). Finalmente, existen ciertas mutaciones en aminoácidos puntuales de Mfn2 asociadas a alteraciones del metabolismo celular (Loiseau et al. 2007), así como a la distancia de las MAMs y al transporte de Ca^{2+} (Basso et al. 2018). El hecho de que exista una relación funcional entre el transporte de Ca^{2+} y el metabolismo y bioenergética mitocondrial, así como la implicación de Mfn2 en ambos procesos, ha propiciado que en estos últimos años se hayan llevado a cabo diversos estudios para relacionar transporte de Ca^{2+} con el metabolismo y la bioenergética mitocondrial con Mfn2 como nexo de unión. En referencia a estos estudios, se ha confirmado ampliamente el papel de Mfn2 para facilitar el transporte de Ca^{2+} hacia las mitocondrias (Bravo et al. 2011; Chen et al. 2012; Seidlmayer et al. 2019) pero aunque parece estar implicado con el metabolismo y bioenergética mitocondrial, no queda del todo claro mediante qué mecanismo.

Las mitofusinas también están implicadas en vías de señalización que determinan el destino celular, como son progresión del ciclo celular, autofagia, estrés del RE, senescencia y apoptosis. Por ejemplo, la sobreexpresión de Mfn2 en distintos modelos celulares suprime la proliferación celular mediante la interacción con Ras y Raf-1 e inhibición de la vía de la kinasa ERK (Chen et al. 2004; Chen et al. 2014). Por su parte, Mfn1 se degrada específicamente durante la fase G2/M por la interacción de la ciclina

B1, facilitando así la fisión mitótica (Park & Cho 2012). Por otro lado, la eliminación de Mfn2 también afecta negativamente a la autofagia, a través de la alteración de las MAMs (Hailey et al. 2010; Hamasaki et al. 2013), e induce estrés del RE en diferentes modelos (Sebastián et al. 2012; Ngoh et al. 2012; Muñoz et al. 2013). La sobreexpresión de Mfn1 induce senescencia a través de la alteración de la dinámica mitocondrial, ya que la senescencia está asociada con una red mitocondrial elongada (Lee et al. 2007). Interesantemente, en este mismo estudio se relaciona una prolongada elongación mitocondrial con una disminución del potencial de membrana mitocondrial, al contrario de lo que suele ser aceptado (Wai et al. 2016), así como un aumento de producción de ROS y daño en el DNA. Por último, referente a la apoptosis, a parte del conocido papel de la fisión mitocondrial como mediador de la apoptosis y la implicación de Mfn2 a través de su papel regulador en las MAMs, Mfn2 también parece jugar un papel anti-apoptótico durante la hipoxia, tanto *in vitro* como *in vivo* (Peng et al. 2015). Referente a esto, también se ha demostrado que en hipoxia los niveles de Mfn2 disminuyen, seguido de una mayor translocación de la proteína pro-apoptótica Bax a la mitocondria y desencadenando de esta forma muerte por apoptosis (Martorell-Riera et al. 2014).

4.3. Doble localización de proteínas en RE y mitocondrias

Las proteínas de membrana constituyen aproximadamente un 35% del total de proteínas codificadas por el genoma (Chio et al. 2017). El correcto funcionamiento biológico de las membranas requiere constantemente la síntesis de nuevas proteínas que deben ser dirigidas a las diferentes membranas. Este proceso es fundamental para la célula ya que establece la identidad y funcionalidad de los distintos orgánulos. La vía más conocida de direccionamiento e inserción proteica en las membranas es la de la partícula de reconocimiento de señal (SRP). Esta ribonucleoproteína permite reconocer un péptido señal de las proteínas nacientes que permite dirigir la proteína hacia el RE y continuar allí su traducción, de manera que se minimiza la agregación de proteínas en el citosol (Akopian et al. 2013). No obstante, un gran número de proteínas de membrana no sigue esta vía y debe dirigirse a las membranas mediante vías post-traduccionales. Un importante ejemplo son las proteínas del tipo “*tail-anchored*” (TA), las cuales contienen un único dominio transmembrana cerca del

extremo C-terminal. Estas proteínas, constituyen el 3-5% del proteoma de membrana y están relacionadas con diferentes procesos celulares (Hegde & Keenan 2011). La combinación de las distintas propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos del dominio transmembrana, así como de la secuencia C-terminal que flanquea al dominio transmembrana, permite discernir hacia que orgánulos se dirigirán las diferentes proteínas TA (Egan et al. 1999; Masaki et al. 2003). Por ejemplo, proteínas TA que posean aminoácidos con carga positiva en la secuencia flanqueante C-terminal serán localizadas en las mitocondrias. También se encontrarán en las mitocondrias, aunque tengan pocas cargas positivas en la secuencia C-terminal, si tienen un dominio transmembrana corto o poco hidrofóbico. Por el contrario, proteínas ancladas en la membrana del RE contienen mayor cantidad de aminoácidos con residuos hidrófobos en la región transmembrana y pocos residuos cargados positivamente flanqueando a la misma en su secuencia C-terminal (Chio et al. 2017; Jiang 2021) (Fig.14.A). Este mecanismo se encuentra finamente regulado, ya que aumentar de manera artificial la hidrofobicidad o la distancia entre el dominio transmembrana y los aminoácidos cargados positivamente de la secuencia C-terminal flanqueante, permite modular la localización de estas proteínas (Rao et al. 2016; Chio et al. 2017; Jiang 2021). Por ejemplo, siguiendo esta estrategia se puede obtener una disminución de localización en mitocondrias de Tom5, proteína típicamente mitocondrial (Horie et al. 2002). Otras aproximaciones similares se han realizado en el citocromo b_5 o Fis1, proteínas TA que localizan tanto en mitocondria como en RE de manera natural. Mediante la mutación o

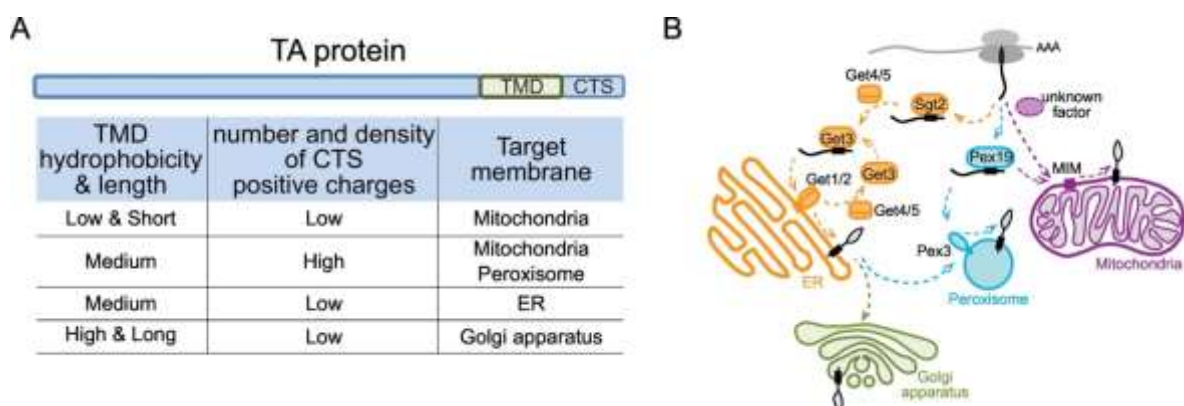


Figura 14. A) Localización de las proteínas *tail-anchored* según el tipo de aminoácidos existentes en su dominio transmembrana (TMD) o zona flanqueante de la secuencia C-terminal (CTS). B) Vías de transporte de las proteínas TA hacia sus orgánulos de destino. Imagen de (Jiang 2021).

substitución de los residuos básicos de la secuencia C-terminal próxima al dominio transmembrana o alterando las modificaciones post-traduccionales ocurridas en los mismos, se ha podido alterar la localización final de las proteínas hacia un orgánulo u otro, así como regularla cuantitativamente (Borgese et al. 2001; Horie et al. 2002; Rao et al. 2016). El propio citocromo b_5 u otras proteínas como SLMAP poseen diferentes isoformas o variantes generadas por *splicing* que localizan en mitocondrias o RE según la variante, ya que estas poseen un mayor o menor contenido de aminoácidos hidrófobos o básicos en las zonas determinantes para su localización (Yeen et al. 2004; Byers et al. 2009).

En modelos de levaduras hace años que se está caracterizando las vías mediante las cuales las proteínas TA son dirigidas al RE, y la mejor caracterizada de ellas es la vía GET (Fig.14B). Esta vía empieza cuando la chaperona Sgt2 capta, en el citosol, las nuevas proteínas TA sintetizadas a través de su TMD hidrofóbico. Después, este complejo es reconocido por las proteínas GET4-5, que ayudan a GET3 a dirigir la proteína TA hacia la membrana del RE, de manera dependiente de ATP. Allí son reconocidas por las proteínas GET1-2, que insertan la proteína TA en la membrana (Mateja & Keenan 2018). La importancia de esta vía en la doble localización de proteínas en RE y mitocondrias radica en que se ha observado que las proteínas de la vía GET pueden reconocer proteínas típicas de la MME mitocondrial e insertarlas de manera errónea en el RE (Vitali et al. 2018). Esto sucede cuando dichas proteínas mitocondriales son sobreexpresadas o cuando se enmascara la zona de aminoácidos que determina su localización mitocondrial, aunque se desconoce el mecanismo que permite este fenómeno (Vitali et al. 2018). Pese a que se ha avanzado mucho en el entendimiento del mecanismo de localización de las proteínas TA, sobre todo en el RE, todavía se desconoce cómo se dirigen a las mitocondrias, o incluso si está asistido por proteínas o si se realiza de manera espontánea (Chio et al. 2017; Jiang 2021). Por lo tanto, pese a existir desde hace años evidencias de doble localización (Koch et al. 2005; Gandre-Babbe & Van Der Bliet 2008; de Brito & Scorrano 2008), e incluso triple localización (Costello et al. 2017), de proteínas de manera natural en RE, mitocondrias y peroxisomas, se desconoce el mecanismo que gobierna este fenómeno.

Por su parte, las mitofusinas 1 y 2 fueron identificadas originariamente como proteínas mitocondriales, ya que igual que sus homólogas en *Drosophila* o levadura, su principal función descrita era la de promover la fusión mitocondrial (Hales & Fuller 1997; Santel & Fuller 2001; Rojo et al. 2002). Desde el primer momento, se determinó que los dos dominios transmembrana era cruciales para que Mfn2 se dirigiera a las mitocondrias (Santel & Fuller 2001). Además, también se demostró que solo la presencia de los dominios transmembrana y el dominio C-terminal (HR2) era suficiente para localizar en la mitocondria (Rojo et al. 2002), por lo que el dominio N-terminal (HR1 y GTPasa) no estaría relacionado con este proceso.

Aunque Mfn2 se considera una proteína del tipo “*multi-span*”, debido a que tiene dos dominios transmembrana conectados por un pequeño bucle, en vez de uno (Dukanovic & Rapaport 2011), diferentes experimentos han mostrado que el mecanismo de localización de Mfn2 en la MME de las mitocondrias es el característico de las proteínas TA. Además de contener aminoácidos cargados positivamente presentes en la secuencia C-terminal que flanquea el dominio transmembrana de Mfn2, igual que las proteínas TA, reemplazando dichos aminoácidos por otros de carácter hidrofóbico, se consigue localizar a Mfn2 en el RE (Rojo et al. 2002). Con el hecho de que años más tarde se ha identificado en el RE a Mfn2, pero no a Mfn1, concretamente en las MAMs (de Brito & Scorrano 2008), han surgido diferentes incógnitas, como por ejemplo por qué Mfn2 y no Mfn1 localiza en el RE, o cuál es el mecanismo por el que Mfn2 pasa a localizarse también en la membrana del RE y si éste está relacionado con la dualidad observada en la localización de algunas de las proteínas TA.

5. El sistema nervioso

El sistema nervioso conforma una compleja red de células especializadas que permite la conducción de señales eléctricas a través de todo el cuerpo. Anatómicamente, está formado por el encéfalo, la médula espinal (ambos englobados en el sistema nervioso central) y todos los nervios que se proyectan a partir de ella (constituyentes del sistema nervioso periférico) (Tripathi & Sieber 2020). Las unidades que forman este complejo sistema son las neuronas, cuya función principal es transmitir información a

través de señales químicas y eléctricas, y las células gliales, las cuales realizan funciones auxiliares, pero esenciales, que complementan y protegen a las neuronas, las responsables principales de la función nerviosa (Jäkel & Dimou 2017). El sistema nervioso se considera el centro de control del cuerpo humano, el cual coordina todas las funciones sensitivas y motoras que permiten a los seres humanos relacionarse con su entorno, así como controlar todos los procesos internos mediante la estimulación de hormonas o enzimas (Sousa et al. 2017). Es por esta razón que en humanos tarda casi dos décadas en desarrollarse por completo (Silbereis et al. 2016). Dado su compleja composición y funciones, y aunque se han hecho muchos avances al respecto, éste sigue siendo de los pocos sistemas del cuerpo humano, por no decir el único, que sigue sin comprenderse, y es por eso que actualmente hay grandes proyectos distintos en marcha a nivel mundial (Grillner et al. 2016), con el objetivo de descifrar los enigmas que conlleva. En 2013 se iniciaron a nivel tanto europeo como estadounidense los llamados *The Human Brain Project* (Markram et al. 2011; Amunts et al. 2019) y *BRAIN Initiative* (Alivisatos et al. 2012; Jorgenson et al. 2015), respectivamente. El primero de ellos actualmente se encuentra en su fase final y desde entonces ha dado lugar a casi 1500 publicaciones, mientras que el otro acumula más de 1200 publicaciones. Además, posteriormente otros países como Japón (Okano et al. 2015) o China (Poo et al. 2016) también han querido sumarse con sus propios proyectos en esta compleja empresa.

5.1. Formación del SNC

El sistema nervioso central (SNC), el cual está formado por el encéfalo y la medula espinal, es de los primeros sistemas que empiezan a formarse durante el desarrollo embrionario, a partir de las tres semanas de gestación en humanos (Stiles & Jernigan 2010) y del día de gestación 10.5-11 y 9-9.5 en ratas y ratones, respectivamente (Semple et al. 2013). En este momento del desarrollo embrionario se ha formado la notocorda, y a partir de su ectodermo, una de las tres capas germinales, se forma la placa neural, la cual marca el inicio del desarrollo del SNC (Purves et al. 2001).

De manera muy simplificada, a partir de la placa neural, se forma el tubo neural, el cual queda segmentado en diferentes regiones que posteriormente darán lugar al encéfalo

y la médula espinal (Silbereis et al. 2016). Durante la formación y segmentación del tubo neural se inicia el proceso de neurogénesis a partir de células progenitoras neuronales que se encuentran en un área concreta llamada zona ventricular y que previamente se han multiplicado hasta alcanzar un número suficiente para llevar a cabo el proceso. Es entonces cuando estas células progenitoras realizan una serie de divisiones asimétricas mediante las cuales se generan nuevas células progenitoras y neuronas que no se dividen de nuevo, y que migran y se desarrollan para formar otras estructuras y generar la expansión del SNC (O’Rahilly & Müller 2006). De manera paralela ciertas células progenitoras neuronales sufren transiciones que permiten la generación de distintos tipos progenitores, mediante complejos mecanismos moleculares, epigenéticos y de expresión diferencial de distintos factores de transcripción (Meyer 2007; Silbereis et al. 2016). Estos mecanismos permiten que los diferentes segmentos del tubo neural lleven a cabo un proceso de organización por el cual se forman las distintas estructuras de los mismos, como por ejemplo las distintas áreas sensoriomotoras de la corteza cerebral (Ypsilanti & Rubenstein 2016).

Durante su formación (Fig.15), el encéfalo crece siguiendo una trayectoria sigmoide, si se compara su peso con el estadio de desarrollo del individuo, siendo la línea recta de la función sigmoide el período de máximo crecimiento (Dobbing & Sands 1979), el cual se denomina en inglés brain growth spurt. En humanos, en el momento del nacimiento el encéfalo ya ha superado el período de máximo crecimiento, aunque tras el mismo

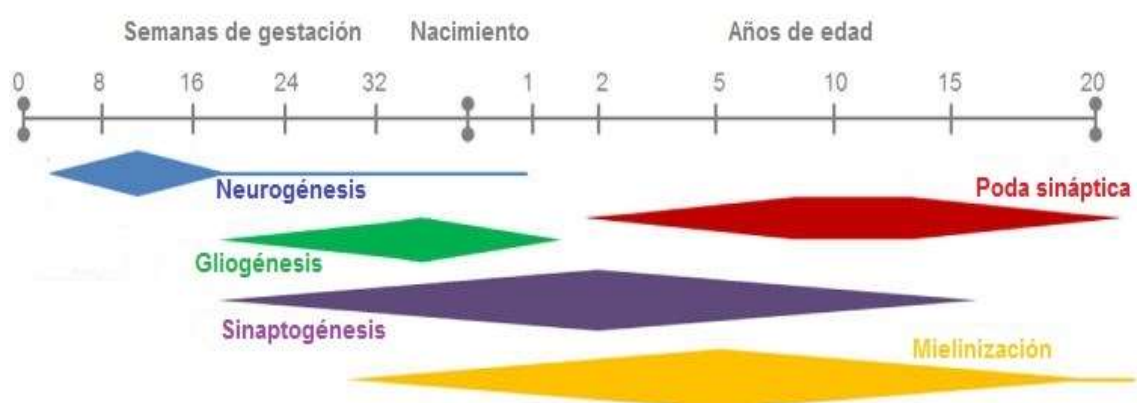


Figura 15. Cronología de los procesos más importantes que forman parte del desarrollo del encéfalo humano. Imagen modificada de (Semple et al. 2013).

continúa desarrollándose, aumentado 4 veces su tamaño hasta alcanzar el 90% del volumen total a la edad aproximada de 6 años. A partir de este momento y hasta la adolescencia, el cerebro se acaba de desarrollar por completo dándose procesos como la maduración sináptica y la mielinización (Stiles & Jernigan 2010). Por su parte, en roedores, el periodo de máximo crecimiento del encéfalo no se alcanza hasta 7 días después del nacimiento, llegando al 90% del volumen total a los 20 días tras el mismo (Semple et al. 2013). En ambas especies, durante el periodo postnatal el nivel de conectividad del encéfalo que está desarrollándose sobrepasa por mucho al de los adultos. No obstante, esta gran conectividad se irá reduciendo por procesos competitivos influenciados por la experiencia adquirida por el organismo, fenómeno conocido como poda sináptica. De este modo queda patente la capacidad adaptativa y de plasticidad que tiene el encéfalo en desarrollo (Innocenti & Price 2005).

5.2. El crecimiento neurítico

Una vez las neuronas han alcanzado su localización final tras el proceso de neurogénesis y migración, se inicia la formación de la red neuronal mediante la formación de sinapsis (Fig.15). Las sinapsis conforman estructuras especializadas para la comunicación interneuronal, basadas en la recepción, procesamiento y transmisión de información en forma de señales químicas y eléctricas, proceso que define al SNC en sí. En humanos, el proceso de formación de nuevas sinapsis empieza durante el desarrollo embrionario, alrededor de las 20 semanas de gestación, aunque sufre un gran incremento durante los primeros años de vida (Semple et al. 2013). Este hecho hace que durante la infancia haya dos o tres veces más sinapsis que en la edad adulta, por lo que pasado este periodo el número de sinapsis se va reduciendo hasta formar el encéfalo maduro junto con el proceso de mielinización (Innocenti & Price 2005). Por su parte, en roedores, este proceso se alcanza tras los 20 días de vida, coincidiendo también con la finalización del periodo de máximo crecimiento del encéfalo (Semple et al. 2013).

No obstante, antes de la formación de las sinapsis es necesario el desarrollo de las estructuras que permiten el establecimiento de las mismas, como son los axones y las dendritas, llamadas neuritas en conjunto, y que constituyen proyecciones del soma

(Silbereis et al. 2016). El crecimiento de estas proyecciones también es un proceso clave durante la migración neuronal y su diferenciación, y es por eso que el desarrollo de axones y dendritas se inicia durante las primeras fases del desarrollo neuronal (Semple et al. 2013). Un complejo proceso de señalización intracelular está implicado en el inicio de la protrusión y su posterior elongación, y aunque en general muchos elementos de la maquinaria del proceso son comunes en distintas áreas encefálicas, existen notables diferencias entre los distintos subtipos neuronales (Khodosevich & Monyer 2010). Cabe destacar que aunque ambas son prolongaciones del soma y son esenciales para la transmisión de los impulsos nerviosos, son totalmente diferentes en ciertos aspectos. Por ejemplo, morfológicamente sus diferencias se pueden observar a simple vista mediante microscopía. Mientras que los axones son típicamente delgados, largos y poco ramificados, las dendritas son relativamente cortas, más ramificadas y con una anchura que disminuye gradualmente a medida que se alejan del soma (Sargent 1989). A nivel funcional también hay diferencias, por un lado las dendritas constituyen la parte receptiva de la neurona. Estas estructuras contienen espinas dendríticas, protuberancias donde se producen las sinapsis, las cuales permiten recibir información mediante sus quimiorreceptores interaccionando con neurotransmisores liberados por los terminales sinápticos de los axones de otras neuronas. En respuesta a la información recibida, las dendritas se encargan de transferir la señal al soma mediante despolarizaciones de la membrana (Arimura & Kaibuchi 2007). Por otro lado, en respuesta a la información recibida por las dendritas, en los axones tiene lugar el transporte del impulso nervioso hasta los terminales sinápticos en forma de potenciales de acción, los cuales liberaran los neurotransmisores que tienen almacenados en vesículas a la hendidura sináptica (Tripathi & Sieber 2020).

El proceso de formación de axones y dendritas ha sido ampliamente estudiado y descrito en cultivos de hipocampo de embriones de rata *in vitro* (Fig.16) (Dotti et al. 1988; Higgins et al. 1997; Da Silva & Dotti 2002; Arimura et al. 2004; Govek et al. 2005), modelo parecido al utilizado en esta tesis. Tras su siembra, las neuronas tienen forma redondeada y se adhieren a la placa de cultivo formando lamelopodios a las pocas horas (1). Unas horas más tarde, entre los lamelopodios empiezan a aparecer las primeras pequeñas neuritas (2). Estas neuritas son extensiones cilíndricas que no

poseen las características moleculares o estructurales de las neuritas maduras, y continuamente se extienden y retraen, pero sin generar un crecimiento neto. No obstante, tras un día y medio en cultivo, una de estas neuritas crece rápidamente para empezar a formar el axón (3). Durante los días siguientes, aparte de continuar creciendo el axón, el resto de neuritas también crecen, pero a un ritmo más pausado, formando múltiples dendritas (4). Finalmente, al cabo de una semana el axón continúa creciendo y las dendritas se encuentran en proceso de ramificación, habiéndose formado las espinas dendríticas que permitirán la formación de sinapsis y la generación de actividad eléctrica espontánea a través de la red neuronal (5).

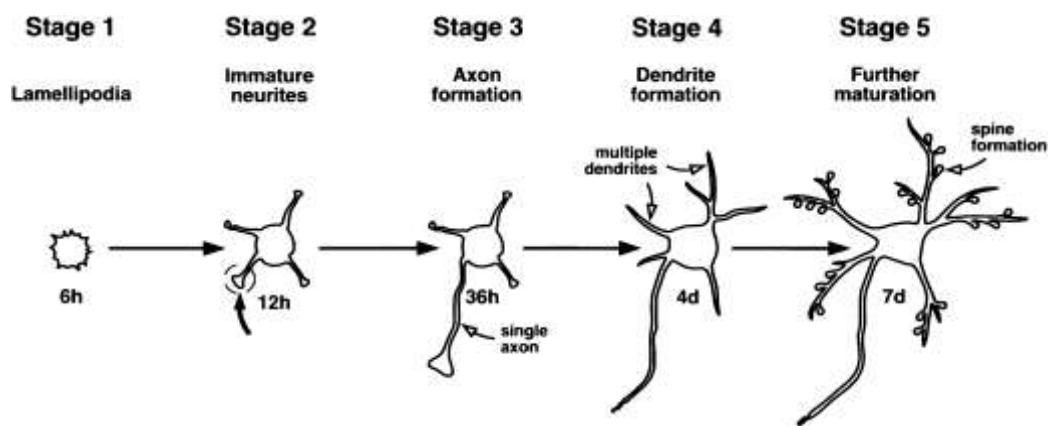


Figura 16. Fases del desarrollo neuronal *in vitro* en un cultivo de neuronas de hipocampo. Imagen de (Govek et al. 2005).

No obstante, dadas las claras diferencias tanto morfológicas como funcionales que se observan entre axones y dendritas, no es de extrañar que también existan diferencias en su desarrollo. Tal como se ha descrito, el crecimiento axonal precede al dendrítico, y uno de las principales características distintivas del mismo es el proceso de polarización neuronal, en la cual una de las neuritas inmaduras incrementa drásticamente su crecimiento para generar el axón (Bradke & Dotti 2000). De entre los factores que regulan tanto la polarización como el crecimiento neuronal destacan las neurotrofinas, una serie de factores de crecimiento que son secretados y permiten regular el mantenimiento, desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (Huang & Reichardt 2001); así como las GTPasas Rho, las cuales activan una serie de cascadas de señales relacionadas también con la formación de espinas dendríticas y la guía espacial del axón (Govek et al. 2005). También se ha demostrado, que en este proceso juegan un papel importante las moléculas de la matriz extracelular, como la laminina (Turney

& Bridgman 2005), y la propia actividad sináptica, a través de cascadas de señalización activadas por la entrada de Ca^{2+} (Meyer-Franke et al. 1998; Segarra-Mondejar et al. 2018). Por su parte, el crecimiento dendrítico presenta una gran ramificación como hecho característico, en la cual las dendritas primarias emergen del soma dando lugar a dendritas secundarias y terciarias. Este proceso sigue diferentes patrones en función de la clase neuronal y es dinámico, ya que combina tanto la generación de ramificaciones nuevas como el mantenimiento o retraimiento de las ya existentes (Nakazawa et al. 2018). El crecimiento y ramificación dendrítica está modulado por diferentes señales procedentes de la interacción con células vecinas, de la estimulación de neuronas pre-sinápticas que transmiten información desde los órganos sensoriales o de la señalización retrógrada de neuronas post-sinápticas (Wong & Ghosh 2002), por lo que puede ser promovida por estímulos del entorno (Leggio et al. 2005; Bose et al. 2010).

5.3. Implicación del RE y las mitocondrias en el crecimiento neurítico

De manera general, aunque la producción de ATP es más eficiente en la fosforilación oxidativa que en la glicólisis, la glicólisis está más activa en células indiferenciadas proliferativas ya que, a parte del ATP, requieren diversas sustancias metabólicas que se generan en esta vía o en vías derivadas de la misma (Lees et al. 2017). No obstante, durante la diferenciación y maduración, el metabolismo se apoya más en la fosforilación oxidativa ya que las células necesitan grandes cantidades de energía para llevar a cabo los procesos de homeostasis y las nuevas funciones especializadas que han adquirido (Xu et al. 2013). Este hecho, igual que en otros tipos celulares, también se cumple en las neuronas, donde se lleva a cabo una reprogramación génica durante la diferenciación y desarrollo de las mismas en la cual el peso de su metabolismo recae sobre la fosforilación oxidativa en detrimento de la glicólisis aerobia (Agostini et al. 2016; Zheng et al. 2016).

Las neuronas en desarrollo se caracterizan por el crecimiento y la extensión de sus axones y dendritas. Se necesita grandes cantidades de energía para sustentar la rápida formación de los largos axones, tanto para formar estas nuevas estructuras como para transportar eficientemente moléculas hasta sus terminaciones. Por este motivo, el

número de mitocondrias por neurona aumenta durante la diferenciación neuronal y su maduración (Cheng et al. 2012). Aunque el ATP generado en el soma puede difundir por el citosol, es necesaria la localización de las mitocondrias en los terminales axónicos durante el crecimiento de los mismos y la formación de sinapsis (Vaarmann et al. 2016). Frente a esto, las propias mitocondrias son las encargadas de suministrar el ATP necesario para modular los filamentos de actina hacia el terminal axónico (Son & Han 2018). Por su parte, las proteínas Miro 1 y 2, dos GTPasas Rho que se encuentran en la MME, junto con las proteínas adaptadoras mitocondriales Milton, forman un complejo que se asocia con kinesinas y promueve de manera esencial el proceso de transporte y motilidad mitocondrial a través de los microtúbulos y filamentos de actina (López-Doménech et al. 2018; Lee & Lu 2014), de manera regulada por Ca^{2+} (Wang & Schwarz 2009; Nemani et al. 2018). Las mitocondrias son especialmente necesarias en los terminales sinápticos, tanto de las neuronas pre-sinápticas como post-sinápticas, no solo proveyendo grandes cantidades de ATP para sostener la transmisión de señales entre ambas, sino también modulando los incrementos citosólicos de Ca^{2+} tras la actividad sináptica (Li et al. 2004). Por lo tanto, si las mitocondrias no se localizan en estas regiones o no están funcionalmente activas, el estado fisiológico y funcional de las neuronas se ve alterado durante el desarrollo y después del mismo (Calkins et al. 2011). Cuando las mitocondrias no funcionan correctamente, se observan alteraciones en la eficiencia de diferenciación de las neuronas durante el desarrollo, es decir, en la neurogénesis (Lorenz et al. 2017), así como en el crecimiento neurítico (Mattson & Partin 1999; Nguyen et al. 2018). Es por eso que el estado disfuncional de las mitocondrias está asociado con muchas patologías neurológicas (Martín et al. 2005; Distelmaier et al. 2008; Zsurka & Kunz 2015; Son & Han 2018; Nguyen et al. 2018), denotando la especial importancia de este orgánulo en las neuronas. Además, no solo el transporte mitocondrial supone un mecanismo de vital importancia para el desarrollo neuronal, sino que también ha sido ampliamente demostrada la importancia de un proceso muy relacionado, como es la dinámica mitocondrial (Chan 2006; Chen & Chan 2006; Chen et al. 2007). Este mecanismo permite una adaptación muy precisa de la morfología mitocondrial a las necesidades de la neurona en desarrollo, hecho que ayuda a complementar el mecanismo de transporte a través de

la neurona y así satisfacer de manera óptima sus demandas energéticas (Khacho & Slack 2018).

Desde hace años se ha descrito que Mfn2 tiene un papel directo en el desarrollo neuronal, *a priori* a través de su función de fusión mitocondrial (Chen et al. 2007; Detmer & Chan 2007). No obstante, se ha demostrado que Mfn2, pero no Mfn1, es necesaria para el crecimiento neurítico, la formación de espinas dendríticas y la supervivencia neuronal en células de Purkinje, un tipo de neurona GABAérgica localizada en el cerebelo (Chen et al. 2007). Consiguientemente, el hecho de que Mfn1 sea más eficiente que Mfn2 en la fusión mitocondrial (Chen et al. 2003), sugiere que la importancia de Mfn2 podría ser debida a otra de sus funciones. Por otro lado, también se ha demostrado que Mfn2, pero no Mfn1, es esencial para el transporte de las mitocondrias a través de los axones (Baloh et al. 2007; Lee et al. 2012; Pham et al. 2012), a través de la interacción con el complejo de proteínas Miro/Milton, la cual ayuda a acoplar las mitocondrias con los microtúbulos (Misko et al. 2010). Por último, también se ha observado que la pérdida de Mfn2 afecta negativamente al proceso de sinaptogénesis, no solo produciendo alteraciones en la morfología y movilidad mitocondrial, sino también en la bioenergética (Fang et al. 2016).

Respecto al RE, su morfología juega un papel importante en la generación de la arquitectura neuronal, ya que el RE periférico no solo debe ocupar el soma, sino también las dendritas y los axones (Cui-Wang et al. 2012). Tanto axones como dendritas dependen del RE para almacenar el Ca^{2+} necesario para suplementar la señalización sináptica, así como para la síntesis y el tráfico de lípidos necesarios para apoyar su crecimiento durante el desarrollo neuronal (Renvoisé & Blackstone 2010). Es por eso, que el tipo de RE que se encuentra en las neuritas no contiene ribosomas (Spacek & Harris 1997), ya que en vez de las funciones de síntesis y translocación de proteínas, en estas estructuras son más necesarias las funciones de síntesis de lípidos y almacenamiento de Ca^{2+} (Ramírez & Couve 2011). Dada la importancia de sus funciones, del mismo modo que las mitocondrias, es necesario que el RE también se extienda por las neuritas a través del citoesqueleto, incluso llegando a penetrar en el interior de las espinas dendríticas, donde modulan la respuesta sináptica mediante la regulación de los picos de Ca^{2+} (Holbro et al. 2009). No obstante, aunque el RE llega a

puntos tan distales del soma como es el axón o las espinas dendríticas, todo el RE comparte el mismo lumen, por lo que constituye una enorme red intracelular interconectada que permite una rápida difusión y equilibrio de Ca^{2+} por toda la neurona. Este hecho permite que señales locales recibidas por el RE a partir de eventos sinápticos puedan transmitirse hacia el soma, modulando a su vez la síntesis de proteínas, la regulación de la expresión de genes, la plasticidad sináptica o incluso las funciones de orgánulos con los que actúan de manera sinérgica, como son las mitocondrias (Myoung Kyu Park et al. 2008). De este modo, el RE actúa como un centro de control de los eventos sinápticos que están ocurriendo a lo largo de toda la neurona, por lo que es importante un correcto transporte de la red reticular por el interior de la misma. Este hecho queda patente cuando se eliminan proteínas del RE implicadas en este proceso, lo cual se traduce en la retracción del RE y un menor crecimiento de las neuritas (Shim et al. 2008; K. Watanabe et al. 2016). Este puede ser entonces uno de los motivos por los cuales mutaciones en genes que codifican para proteínas que determinan la estructura del RE están relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, como son la enfermedad de Alzheimer (He et al. 2004) y los síndromes de paraplejia espástica hereditaria (McCorquodale et al. 2011). Además, otro proceso en el cual está directamente relacionado el RE, como es el estrés del RE, también está implicado en trastornos como es el autismo, en el cual se observa un crecimiento y desarrollo neuronal alterado en el SNC (Kawada et al. 2018), hecho que denota también la importancia de este orgánulo en el desarrollo neuronal.

5.4. El sistema glutamatérgico y la excitotoxicidad

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos adultos, ya que las sinapsis glutamatérgicas constituyen un 40% del mismo (Fairman & Amara 1999). A parte de promover la rápida comunicación entre neuronas mediante la transmisión sináptica, también juega un papel importante en el crecimiento neuronal, el desarrollo y maduración del cerebro y la plasticidad sináptica, los cuales contribuyen a los procesos de aprendizaje y memoria (Suzuki et al. 2006). No obstante, dado que el glutamato juega un papel tan importante en el cerebro, desde ya hace años se ha observado que la alteración del sistema glutamatérgico es un proceso clave en la fisiopatología de la muerte neuronal

(Ankarcrona et al. 1995; Lankiewicz 2000; Sattler & Tymianski 2001). En condiciones basales, la concentración de Ca^{2+} citoplasmático de las neuronas se encuentra alrededor de 100 nM, aunque las neuronas pueden tolerar grandes aumentos de Ca^{2+} citoplasmático (del rango micromolar), pero solo si estos cambios son transitorios y los niveles basales se recuperan en cuestión de segundos o pocos minutos (Mattson 2019). No obstante, frente a una activación demasiado intensa o prolongada de los receptores de glutamato se desencadena una cascada de neurotoxicidad, conocida como excitotoxicidad, la cual resulta en la degeneración de las dendritas y, finalmente, en muerte celular (Mattson 2019).

El sistema glutamatérgico realiza la neurotransmisión del glutamato a través de diferentes tipos de receptores. Por un lado, existen receptores ionotrópicos, en los que el glutamato ejerce de ligando y permite el paso de distintos cationes, como Na^+ , K^+ o Ca^{2+} a través de su canal central, los cuales van a producir corrientes excitatorias (Reiner & Levitz 2018). Por otro lado, existen receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, que controlan distintos procesos celulares mediante cascadas de señalización a partir de estas mismas proteínas (Reiner & Levitz 2018). Los receptores ionotrópicos son los primeros receptores en intervenir en la excitotoxicidad, y se pueden dividir funcionalmente en tres clases, conocidos como NMDAR, AMPAR y KAR (Niedzielski & Wenthold 1995). Entre estos receptores, el receptor de NMDA (NMDAR), se ha postulado como el principal responsable de la excitotoxicidad, debido a su alta permeabilidad a iones Ca^{2+} (Hansen et al. 2017). Este receptor está formado por un tetrámero de subunidades que forman un poro central, que actúa como canal, y requiere para su activación la unión simultánea de glutamato y un co-agonista, como glicina o D-serina (Guo et al. 2017). Además, en condiciones basales de potencial de membrana, el Mg^{2+} bloquea el poro del canal. Cuando el Mg^{2+} es eliminado, el receptor de NMDA se puede activar y permitir la entrada de Ca^{2+} y Na^+ , provocando la despolarización de la neurona postsináptica y la generación del consiguiente potencial de acción (Wang & Qin 2010). La diversidad de subunidades y su ensamblaje da como resultado diferentes subtipos de receptores de NMDA, los cuales difieren en sus propiedades funcionales, cinéticas y conductancias, hecho que repercute tanto en la plasticidad como en la función neuronal (Armada-Moreira et al. 2020).

En condiciones fisiológicas, la activación de los receptores de glutamato provoca la despolarización de la neurona postsináptica mediante la entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} a través de la membrana celular, como resultado de la apertura de los propios receptores y de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Mehta et al. 2013). Concretamente, este incremento en los niveles de Ca^{2+} provoca la estimulación de la respiración mitocondrial gracias a la activación de deshidrogenasas mitocondriales y otras proteínas citosólicas (Fig.17A) (Rueda et al. 2016). De este modo, la neurona responde al aumento de requerimientos energéticos necesarios para activar los mecanismos que permitan recuperar de nuevo los niveles basales de Ca^{2+} y Na^+ , los cuales son dependientes de ATP (Harris et al. 2012). No obstante, una sobreactivación persistente de estos receptores provoca un aumento continuo y acusado de Ca^{2+} intracelular, que desencadena una serie de mecanismos que se retroalimentan a sí mismos, en una cascada de acontecimientos que llevarán a la célula hacia su muerte (Wang & Qin 2010). Inicialmente, las neuronas morirán por necrosis, pero aquellas que sobrevivan pueden llevar a cabo un proceso tardío de muerte por apoptosis de manera dependiente de las mitocondrias (Ankarcrona et al. 1995). Por ejemplo, la entrada masiva de Ca^{2+} promueve la activación ciertos factores de transcripción como NF κ B, el cual se ha demostrado que precede la apoptosis (Qin et al. 1998), y de enzimas degradadoras de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Berliocchi et al. 2005). Por otro lado, esta entrada masiva de Ca^{2+} hacia el citoplasma se ve acrecentada por la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares, como son las mitocondrias y el RE, a causa de la alteración de los gradientes iónicos, los cuales dañan la propiedades funcionales de las membranas (Mehta et al. 2013). No solo mitocondrias y RE se ven afectados durante la excitotoxicidad, sino que es un proceso que afecta a todos los orgánulos, y entre ellos se establecen distintas vías de señales (Yuan et al. 2003). No obstante, concretamente el papel del RE y las mitocondrias a través del Ca^{2+} es de vital importancia en este proceso (Mattson 2019).

En cuanto a las mitocondrias, tras la entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma, proceden a capturar el exceso de Ca^{2+} mediante el canal MCU para así intentar mantener una concentración citoplasmática de Ca^{2+} baja (Qiu et al. 2013). Para ello, actúan de manera coordinada con los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) de la membrana

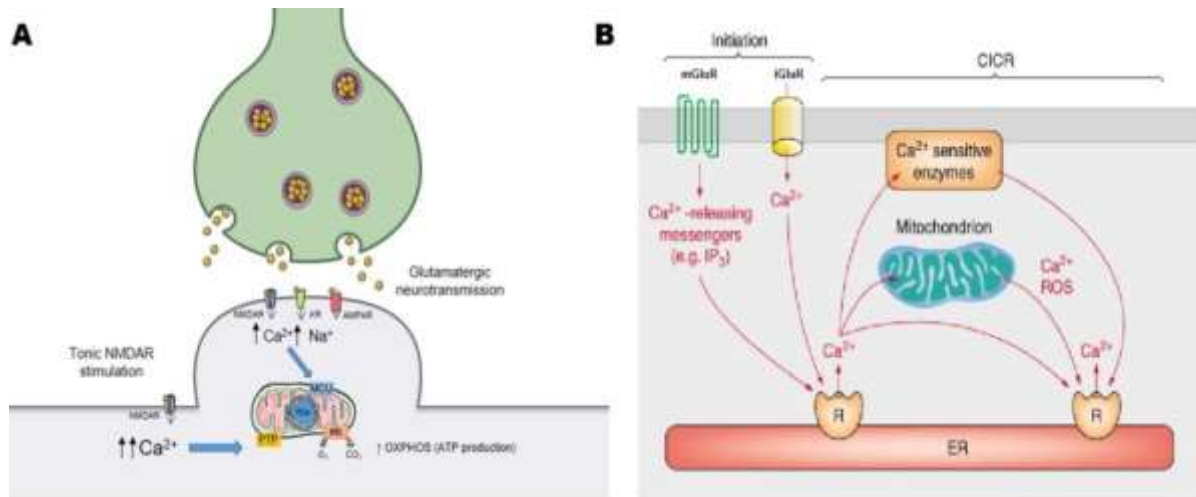


Figura 17. A) Entrada de Ca^{2+} en la neurona postsináptica mediante neurotransmisión glutamatergica en condiciones fisiológicas y posterior activación mitocondrial. Imagen modificada de (Rueda et al. 2016). B) Entrada de Ca^{2+} en la neurona postsináptica a través de receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) e ionotrópicos (iGluR) y posterior mecanismo de liberación de Ca^{2+} del RE inducido por Ca^{2+} (CICR). Imagen modificada de (Roderick et al. 2003).

plasmática, los cuales bombean Ca^{2+} hacia el exterior usando la fuerza motriz del flujo de Na^+ entrante (White & Reynolds 1995). No obstante, aunque temporalmente las mitocondrias consigan mantener la homeostasis de Ca^{2+} , en eventos excitotóxicos, la excesiva captación de Ca^{2+} hacia las mitocondrias conlleva la despolarización de su membrana, alterando la producción de ATP y sus funciones antioxidantes (Lai et al. 2014). Todos estos fenómenos se traducen en un estrés energético y oxidativo y una sobreproducción de ROS, por lo que se acentúa el estado de disfunción mitocondrial y se compromete todavía más la viabilidad celular (Wang & Qin 2010; Connolly & Prehn 2015; Armada-Moreira et al. 2020). En paralelo, la despolarización de la membrana mitocondrial causada por el exceso de Ca^{2+} capturado, también promueve la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm) y la liberación de proteínas pro-apoptóticas, permitiendo la activación de caspasas y calpains que llevarán a cabo la apoptosis (Lipton 2008; Caldeira et al. 2014). No obstante, como ya se ha comentado, todas estas alteraciones también pueden promover muerte por necrosis en primera instancia (Golstein & Kroemer 2007). Por lo tanto, la alteración mitocondrial tiene un impacto crítico en el estado energético neuronal y en la posterior progresión hacia su muerte (Wang & Qin 2010).

En relación al RE, la activación de los receptores metabotrópicos estimula la producción de IP₃ (Sladeczek et al. 1985), el cual promueve la liberación de Ca²⁺ desde el RE (Finch & Augustine 1998). Durante la excitotoxicidad, esta liberación de Ca²⁺ no ocurre únicamente desde los canales IP₃R, sino también desde los RyR, y contribuye a la misma, ya que inhibiendo la salida de Ca²⁺ del RE desde ambos receptores se reduce la muerte neuronal tras un evento excitotóxico (Ruiz et al. 2009). La liberación de Ca²⁺ desde los canales RyR se lleva a cabo por un proceso inducido y retroalimentado por el propio Ca²⁺ (*CICR*, por sus siglas en inglés) (Verkhatsky & Shmigol 1996; Roderick et al. 2003). Además, inhibiendo la salida de Ca²⁺ del RE también se observa también un menor impacto del estrés oxidativo mitocondrial, una menor despolarización de la membrana mitocondrial y una menor actividad de la caspasa-3 (Ruiz et al. 2009), por lo que RE y mitocondrias actúan coordinadamente en este proceso (Fig.17B). Por otro lado, durante la excitotoxicidad también se ha observado la aparición de estrés en el RE, el cual promueve vías pro-apoptóticas de manera tanto dependiente como independiente de las mitocondrias, mediante la UPR (Sokka et al. 2007; Ruiz et al. 2009)

Debido a que las neuronas necesitan grandes cantidades de ATP para mantener y reestablecer los continuos cambios en sus gradientes iónicos (Bélanger et al. 2011), son particularmente vulnerables a eventos excitotóxicos en condiciones de baja disponibilidad de energía, como por ejemplo en hipoglicemia o isquemia (Mattson 2019). La excitotoxicidad causada por los receptores de glutamato está fuertemente asociada con cambios neuroquímicos y neuropatológicos ocurridos durante lesiones neurológicas agudas como los accidentes cerebrovasculares, o en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica (Wang & Qin 2010; Mattson 2019). No obstante, no solo factores genéticos pueden afectar a la vulnerabilidad de las neuronas frente a estos episodios, sino que también puede hacerlo distintos factores ambientales tales como la dieta, el ejercicio, exposición a toxinas, etc.

En relación con las condiciones de baja disponibilidad de energía, varios estudios han demostrado que tanto en modelos *in vitro* de hipoglicemia como en modelos *in vivo* de isquemia, los niveles de Mfn2 se encuentran disminuidos (Kumari et al. 2012; Wappler

et al. 2013; Martorell-Riera et al. 2014). Además, en tratamientos *in vitro* con NMDA para recrear condiciones excitotóxicas, se ha observado que también disminuyen los niveles de Mfn2 a la par que aparecen alteraciones en la bioenergética mitocondrial y la homeostasis del Ca^{2+} (Martorell-Riera et al. 2014; W. Wang et al. 2015). Concretamente, esta disminución sucede de manera transcripcional mediante la degradación del factor de transcripción MEF2 (Martorell-Riera et al. 2014), el cual juega un papel clave en el desarrollo del cerebro, de la sinapsis neuronal y su supervivencia (Flavell et al. 2008).

5.5. Enfermedades neurológicas relacionadas con Mitofusina 2

De entre todos los tipos celulares, las neuronas son particularmente sensibles a defectos en Mfn2, ya que sus mitocondrias son esenciales para una regulación precisa del Ca^{2+} y satisfacer sus altos requerimientos energéticos (Celsi et al. 2009; Bélanger et al. 2011). Más de 100 mutaciones dominantes en el gen de Mfn2 han sido halladas en pacientes de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A (CMT2A) (Filadi et al. 2018) (Fig.18), la cual engloba un grupo heterogéneo de neuropatías periféricas hereditarias no inflamatorias caracterizadas por la degeneración axonal de neuronas sensitivas y motoras (Cartoni & Martinou 2009). Las mutaciones más frecuentes, a la par que severas, se encuentran sobre todo en el dominio GTPasa o cerca del mismo, mientras que en menor medida, aunque igualmente severas, también se pueden encontrar en los dominios HR1 y HR2 (Dorn 2020). Fuera de estos dominios se encuentran mutaciones poco comunes y con fenotipo más leve. El aminoácido más frecuentemente mutado es la arginina de la posición 94, perteneciente al dominio GTPasa, y las dos mutaciones que más se repiten son R94W y R94Q (Züchner et al. 2006; Neusch et al. 2007). No obstante, el mecanismo por el cual estos defectos en Mfn2 producen CMT2A todavía está en debate (Dorn 2020). Históricamente, dado que fue la primera función descrita en esta proteína, se ha abordado el tema con el estudio de la dinámica mitocondrial, y aunque se han observado claras alteraciones en la morfología mitocondrial y se ha rescatado el fenotipo sobreexpresando Mfn1 *in vitro* (Detmer & Chan 2007), no siempre aparecen (Loiseau et al. 2007). Otra característica alterada en neuronas frente a mutaciones en Mfn2 es el transporte mitocondrial, por lo que se ha propuesto también cómo el mecanismo causante de la enfermedad (Baloh

et al. 2007; Crunkhorn 2018). A pesar de ello, de nuevo se rescata el fenotipo sobreexpresando Mfn1 (Misko et al. 2012). Al producirse la enfermedad a causa de mutaciones específicas en Mfn2, denota que probablemente sea a raíz de un mecanismo no compartido entre ambas proteínas, y es por eso que estos últimos años se ha pensado en las MAMs. Usando fibroblastos de distintos pacientes con diferentes mutaciones en Mfn2, se ha demostrado que hay una correlación entre la alteración de las MAMs y la severidad de la enfermedad (Larrea et al. 2019). Aunque se observan diferencias entre pacientes, generalmente aparecen alteraciones en la distancia de los contactos y la síntesis de lípidos, pero existen controversias sobre la bioenergética

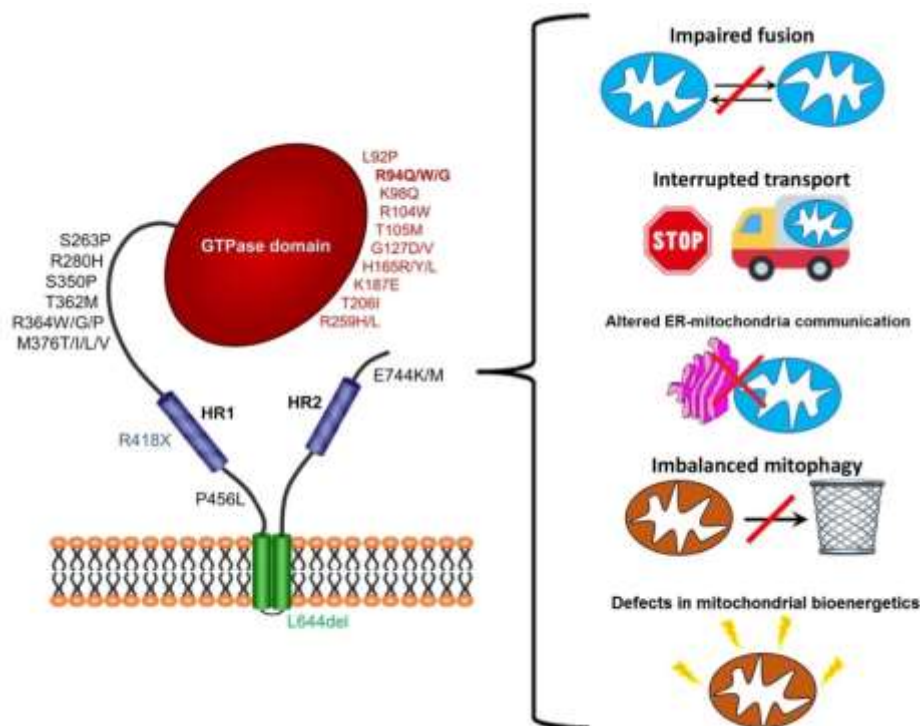


Figura 18. Mutaciones más importantes en Mfn2 relacionadas con la enfermedad de CMT2A y mecanismos propuestos por los cuales podrían estar causando la enfermedad. Imagen modificada de (Filadi et al. 2018) y (Dorn 2020).

mitocondrial (Schiavon et al. 2021). Algunos estudios muestran que la bioenergética mitocondrial no se encuentra alterada (Baloh et al. 2007; Larrea et al. 2019), mientras que otros estudios demuestran la aparición de deficiencias en la misma (Loiseau et al. 2007; Guillet et al. 2010; Saporta et al. 2015; Rocha et al. 2018; Bernard-Marissal et al. 2019). Por lo tanto, aunque las MAMs se postulan como un potencial mecanismo por el cual defectos en Mfn2 causan CMT2A, actualmente no hay suficientes evidencias

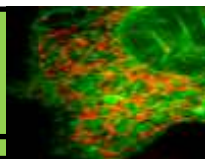
para conocer exactamente la implicación de su vertiente bioenergética. Por otro lado, también se ha descrito que existen alteraciones en la mitofagia, la cual promueve el control de calidad mitocondrial, ya que acumulan mitocondrias dañadas o senescentes en vez de ser eliminadas y recicladas (Rizzo et al. 2016; Filadi et al. 2018).

En otra patología que afecta a las neuronas como es la enfermedad de Alzheimer, también se han observado evidencias de que Mfn2 se expresa de manera reducida en pacientes (Manczak et al. 2011; X. Wang et al. 2009) y modelos de la enfermedad (Chen et al. 2016). No obstante, no se sabe si esta reducción se trata de una causa o una consecuencia de la enfermedad. También en la enfermedad de Parkinson Mfn2 juega un papel importante, ya que es sustrato clave de PINK1/Parkin, las mutaciones de las cuales describen la enfermedad. Además, se ha demostrado que Mfn2, pero no Mfn1, es esencial en las proyecciones axonales de las neuronas dopaminérgicas afectadas por la enfermedad (Lee et al. 2012). Actualmente, se ha propuesto que Mfn2 jugaría un papel importante en ambas enfermedades a través de las MAMs. En el caso del Alzheimer, presenilina-2, una de las proteínas cuyas mutaciones produce la enfermedad, secuestra a Mfn2 y aumenta los contactos (Filadi et al. 2016), mientras que en Parkinson se produce un aumento de Mfn2 en las MAMs que aumenta los contactos de manera excesiva (Gautier et al. 2016). Por otro lado, en pacientes de la enfermedad de Huntington también se han observado alteraciones en la dinámica mitocondrial, así como niveles reducidos de Mfn2 (Shirendeb et al. 2011). Además, tal como ya se ha comentado, cabe destacar también el papel importante que parece jugar Mfn2 en procesos isquémicos o hipoglucémicos, los cuales son especialmente vulnerables a desembocar en excitotoxicidad (Kumari et al. 2012; Wappler et al. 2013; Martorell-Riera et al. 2014; W. Wang et al. 2015). Durante estos episodios Mfn2 es el único miembro de la maquinaria de fusión/fisión cuyos niveles de expresión se ven reducidos, hecho que precede a una disfunción mitocondrial, alteración en la homeóstasis del Ca^{2+} y un aumento en la translocación de Bax a las mitocondrias, que se ve traducido en muerte neuronal (Martorell-Riera et al. 2014; W. Wang et al. 2015).

Asimismo, no solo se ha relacionado la alteración de Mfn2 con patologías del sistema nervioso, sino también en diferentes tipos de cáncer (Wang et al. 2012; Cheng et al. 2014; Rehman et al. 2012), cardiomiopatías (Chen et al. 2011) o en obesidad y diabetes

(Bach et al. 2003; Bach et al. 2005), por lo que su potencial terapéutico no quedaría solo reducido en el marco de las enfermedades neurológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Modelos animales

Los modelos animales constituyen una de las principales herramientas en la investigación biomédica. Concretamente, para realizar este trabajo se han utilizado ratas y ratones estabulados en la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Estos animales son mantenidos por el personal técnico del animalario y todos los procesos a los cuales son sido sometidos cumplen las normas éticas para el cuidado y utilización de animales de experimentación.

La importancia derivada del uso de ratones o ratas reside en que son mamíferos, y gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al de la especie humana, por lo que las observaciones realizadas en estos animales, pueden extrapolarse al humano, objetivo final de cualquier investigación biomédica. Además, estos animales tienen fácil manejo, se reproducen rápidamente y se adaptan a ambientes controlados como el del animalario. Un hecho destacado es la posibilidad de efectuar modificaciones genéticas en ellos de manera relativamente sencilla, generando así un amplio abanico de posibilidades en su estudio. No obstante, la realización de aproximaciones *in vivo* generalmente requiere de metodología y tecnología muy compleja, aunque también se pueden utilizar como fuente para generar cultivos celulares y realizar aproximaciones *in vitro*.

1.1. Ratas

Las ratas utilizadas pertenecen a la cepa *Sprague Dawley*, una de las cepas más usadas en investigación debido a su docilidad y fácil manejo. Estas ratas han sido cruzadas por el personal técnico del animalario de modo que coincida el mismo día de cada semana con el día 19-20 de gestación de la rata gestante, momento en el cual se realizan los cultivos primarios de neuronas corticales con los embriones (ver sección 2.3.). De este modo, se asegura la reproducibilidad de manera precisa de los experimentos realizados.

1.2. Ratones

En el caso de los ratones, se han utilizado ratones transgénicos $Mfn2^{lox/lox}UBC-CRE-ERT2^{+/-}$, los cuales presentan el sistema de recombinación “Cre-Lox” inducible por tamoxifeno. Este sistema consiste en una Cre-recombinasa conjugada a un receptor de estrógeno que se expresa de manera constitutiva y ubicua, pero que se encuentra secuestrada en el citoplasma. Al tratar con tamoxifeno, éste se une al receptor de estrógeno y permite la translocación de la Cre-recombinasa al interior del núcleo celular, donde va a promover la recombinación específica de las regiones “Lox”, que en este caso se encuentran flanqueando el exón 6 del gen de Mitofusina 2 (Mfn2) (Chen et al. 2007).

Periódicamente se han cruzado ratones macho $Mfn2^{lox/lox}UBC-CRE-ERT2^{+/-}$ con hembras $Mfn2^{lox/lox}UBC-CRE-ERT2^{-/-}$ de modo que coincida el mismo día de cada semana con el día 19-20 de gestación del ratón gestante, momento en el cual se genotipan los embriones (ver sección 1.2.) y se realizan los cultivos primarios de neuronas corticales (ver sección 2.3.). De este modo, se asegura la reproducibilidad de manera precisa de los experimentos realizados.

Generación y mantenimiento de la colonia

Para obtener los ratones transgénicos descritos previamente, se ha partido de unos ratones que expresan el exón 6 de Mitofusina 2 (Mfn2) flanqueado por dos regiones de recombinación “Lox” ($B6.129(Cg)-Mfn2^{tm3Dcc}/J$, The Jackson Laboratory, Stock no:026525) (Chen et al. 2007) y unos ratones que expresan una Cre-recombinasa ubicua inducible por tamoxifeno ($B6.Cg-Ndor1^{Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb}/1J$, The Jackson Laboratory, Stock no:007001) (Ruzankina et al. 2007). Se han cruzado estos ratones durante varias generaciones y se ha genotipado (ver sub-apartado correspondiente) la descendencia para comprobar que expresaran las construcciones génicas de interés.

Cabe destacar, que a diferencia de las regiones “Lox”, que deben expresarse de manera homocigota para la correcta recombinación del gen flanqueado, la Cre-recombinasa es preferible que esté presente de manera heterocigota, ya que en homocigosis y aunque no haya presencia de tamoxifeno, se produce una

recombinación basal que resulta letal para los embriones porque suprime la producción de Mfn2, necesaria para el desarrollo embrionario.

Una vez obtenido el genotipo de interés, para garantizar el mantenimiento y expansión de la colonia, se cruzan de manera continua machos y hembras $Mfn2^{lox/lox}UBC-CRE-ERT2^{-/-}$ para obtener hembras $Mfn2^{lox/lox}UBC-CRE-ERT2^{-/-}$ con las cuales se realizan los cruces que resultaran en cultivos neuronales, y machos $Mfn2^{lox/lox}UBC-CRE-ERT2^{+/-}$ con hembras $Mfn2^{lox/lox}UBC-CRE-ERT2^{-/-}$ para obtener machos $Mfn2^{lox/lox}UBC-CRE-ERT2^{+/-}$ con los cuales se realizan los cruces que resultaran en cultivos neuronales. De esta forma, se asegura disponer siempre de los ratones con el genotipo necesario para realizar los posteriores experimentos.

Extracción de ADN de tejido

Con el objetivo de genotipar los ratones, previamente se debe extraer ADN de alguno de sus tejidos. En este caso, el ADN se ha extraído de las puntas de las colas de los embriones con los cuales se han realizado los cultivos neuronales, o con trozos de oreja de ratones adultos los cuales eran marcados con perforaciones en las orejas para facilitar su distinción. El procedimiento es el siguiente:

1. Se añade 0,5 ml de NaOH (50 mM) en el eppendorf que contiene la muestra de tejido y se calienta a 100°C durante 5 minutos.
2. Se pipetea el tejido para disgregarlo mecánicamente y se calienta a 100°C durante 5 minutos.
3. Se añade 60 μ l de Tris-HCl (1 M, pH 6,8) y se calienta a 100°C durante 5 minutos.
4. Se centrifuga durante 15 minutos a 13.000 rpm. En el sobrenadante se encuentra el ADN.

Genotipado

Durante la realización de los cultivos primarios de neuronas corticales o astrocitos murinos, es necesario genotipar los embriones. Del mismo modo, los ratones adultos utilizados para expandir la colonia, también deben ser genotipados para así mantener un control preciso de la colonia. Para ello, se siguen los siguientes pasos:

1. Se extrae el ADN del tejido murino (ver sub-apartado correspondiente).
2. Se realiza el genotipado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ver sección 4.4.) a partir del ADN extraído.
3. Se carga el producto de la PCR en un gel de agarosa al 1% y se realiza una electroforesis (ver sección 4.5.).
4. Se observa el resultado mediante un transiluminador de rayos UV en una cámara oscura.

Inyección de tamoxifeno en crías de ratón

Para administrar a las crías de ratón con tamoxifeno, se prepara un *stock* de tamoxifeno diluido en aceite de maíz a razón de 20 mg/ml, el cual se puede conservar a 4°C. Las inyecciones se realizan a días P1, P4 y P5, siendo P0 el día de nacimiento, mediante el siguiente procedimiento:

1. La dilución *stock* se somete a agitación magnética durante 10 minutos.
2. Se prepara la dilución de trabajo, diluyendo el *stock* nuevamente en aceite de maíz a razón 1:10 (por lo tanto, la concentración de trabajo es 2 mg/ml).
3. Ya en el animalario, se separa la madre de las crías.
4. Se carga el tamoxifeno en una jeringuilla de 1 ml con repetidas absorciones y expulsiones previas para acabar de mezclarlo bien con el aceite de maíz y procurando que no quede ninguna burbuja de aire. Después se coloca la aguja.
5. Antes de empezar con las inyecciones, es importante impregnarse bien los guantes con el serrín de la jaula donde se encuentran las crías, para evitar que posteriormente la madre sacrifique a las crías debido a olores no familiares.
6. Se administra 50 µl por cría mediante una inyección intragástrica, se realiza un suave masaje abdominal para evitar la salida del tamoxifeno por el orificio generado por la aguja y se comprueba que la cría no ha sufrido ninguna complicación.
7. Se junta de nuevo la madre con las crías.

Administración de tamoxifeno en ratones adultos

Para administrar los ratones adultos con tamoxifeno, se prepara un *stock* de tamoxifeno diluido en aceite de maíz a razón de 20 mg/ml, el cual se puede conservar a 4°C. Las administraciones se realizaron a los 9 meses de edad mediante el siguiente procedimiento:

1. La dilución *stock* se somete a agitación magnética durante 10 minutos.
2. Se prepara la dilución de trabajo, diluyendo el *stock* nuevamente en aceite de maíz a razón 1:10 (por lo tanto, la concentración de trabajo es 2 mg/ml).
3. Ya en el animalario, se pesan los ratones.
4. Se carga el tamoxifeno en la jeringuilla adaptada con un tubo especial para alimentación intragástrica.
5. Se agarra el ratón con una mano de forma que quede libre la boca del ratón, sin que éste pueda cerrarla. Con la otra mano se mete el tubo con mucho cuidado por la boca a través de la garganta.
6. Se administra el tamoxifeno a razón de 75 mg tamoxifeno/kg ratón.
7. Se comprueba que el animal no ha sufrido ninguna complicación y se vuelve a dejar en su correspondiente jaula.

2. Cultivos primarios de neuronas corticales y astrocitos

Aunque los estudios en modelos animales son los que presentan mayor validez dado su mayor aproximación *in vivo* a cuestiones biológicas, el uso de cultivos celulares confiere ciertas ventajas frente a éstos en lo que se refiere a su mayor sencillez para estudiar procesos celulares y moleculares. Al trabajar con células en cultivos se puede adoptar un mayor control de las condiciones de trabajo, hecho que permite obtener una mejor reproducibilidad y variabilidad entre experimentos. Además, a este hecho se le añaden las motivaciones éticas y la mayor facilidad de manipulación y cuantificación en los ensayos realizados, entre otros motivos. En el caso del estudio de las neuronas, estos cultivos deben ser primarios, ya que éstas no presentan capacidad de crecimiento o división, por lo que el cultivo tiende a morir a los pocos días. Del mismo modo, los astrocitos poseen una capacidad de crecimiento limitada. Por lo

tanto, cada vez que es necesario trabajar con un cultivo neuronal o de astrocitos, debe ser preparado de nuevo a partir de la disgregación de cortezas cerebrales murinas.

Los cultivos primarios de neuronas corticales o de astrocitos se han realizado siguiendo un protocolo previamente establecido (Soriano et al. 2008). Para ello, en el caso de las neuronas se han utilizado embriones tanto de rata como de ratón a días 19-20 de gestación, los cuales poseen la plasticidad neuronal necesaria para poder realizar los cultivos primarios de manera adecuada. Por lo que hace a los astrocitos, se han utilizado crías a P0-P1, momento en el cual ocurre la astrogénesis.

2.1. Preparación de medios y soluciones

Los medios, soluciones o suplementos utilizados que no son estériles de fábrica, se han esterilizado tras su preparación por filtración en membrana de 0,22 μm de poro o autoclavado. Para la realización de los cultivos primarios de neuronas, su mantenimiento o manipulación, se usan los siguientes medios y soluciones:

- Medio Neurobasal-A (NBA): A una botella de NBA se añade 5,21 ml FBS, 2,6 ml L-Glutamina 200 mM, 2,6 ml P/E y 10,42 ml B-27 50x.
- Medio OptiMEM: A una botella de OptiMEM se añade 4 ml de glucosa 2,5 M y 5 ml P/E.
- Medio MEM: Se usa tal como viene de fábrica, sin suplementar.
- Solución SGG: Para 1L, se añade en agua milli-Q 22,28 ml NaCl 5 M, 29,2 ml NaHCO_3 7,5%, 1,764 ml KCl 3 M, 0,502 MgCl_2 2 M, 2 ml CaCl_2 1 M, 10 ml HEPES 1 M, 1 ml glicina 1 M, 12 ml glucosa 2,5 M, 5 ml piruvato de sodio y 2 ml rojo de fenol 0,5%.
- Medio TM_{ITS} (medio de transfección): Para 100 ml, se mezcla 88 ml solución SGG, 10 ml medio MEM, 0,5 ml P/E y 1,5 ml ITS.
- Medio TM_0 (medio de bajo soporte trófico): Para 100 ml, se mezcla 89 ml solución SGG, 10 ml medio MEM y 0,5 ml P/E.
- Medio de disociación: Para 500 ml, se añade en agua milli-Q 40,9 ml Na_2SO_4 1 M, 60 ml K_2SO_4 0.25 M, 1,46 ml MgCl_2 2 M, 0,126 ml CaCl_2 1 M, 0,5 ml HEPES 1 M, 4 ml glucosa 2,5 M y 1 ml rojo de fenol 0,5%.

- Solución de ácido quinurénico: Para 80 ml, se pesan 158,56 mg ácido quinurénico y se añaden 5 ml agua bidestilada y autoclavada y 0,4 ml rojo de fenol 0,5%. Después de agitar extensamente, se va añadiendo 100 μ l NaOH 1 M hasta que la solución se vuelva rosácea (normalmente se requiere 500 μ l). Finalmente, se añade 0,4 HEPES 1 M y 4 ml MgCl₂ 2 M y se agita de nuevo. Se añade agua bidestilada y autoclavada hasta 80 ml.
- Solución de papaína: Para 50 ml, se mezcla 5ml ácido quinurénico, 45 ml medio de disociación y 22,5 mg L-cisteína. Se corrige el pH añadiendo NaOH 0,2 M hasta que la solución se vuelva rosácea (normalmente 300-800 μ l). Se añade 500 U de papaína, se introduce la solución en el baño a 37°C y se agita con el vórtex repetidas veces para su correcta disolución.
- Solución de disección: Para 40 ml, se mezcla 36ml de medio de disociación y 4 ml de solución de ácido quinurénico, previamente descongelado en un baño a 37°C. Se corrige el pH añadiendo NaOH 100 mM hasta que la solución se vuelva rosácea (normalmente 100-200 μ l).

Por otro lado, para el mantenimiento o manipulación específicamente de los cultivos de astrocitos, además de los medios usados en el cultivo de neuronas (excepto SGG, TM_o y TM_{ITS}), se usa medio DMEM 10% FBS, 1% P/E y 1% L-glutamina.

Los medios y soluciones son conservados habitualmente a 4°C después de su preparación, y en algún caso a -20°C, hasta aproximadamente un mes como máximo, cuando se observa cambios en el color rosáceo a causa de cambios en el pH, momento en el cual se eliminan. Antes de aplicarlos a los cultivos neuronales, se atemperan siempre a 37°C para evitar someterlos a estrés térmico. Los detalles de los medios comerciales utilizados y suplementos añadidos para la preparación de los medios y soluciones descritos se pueden consultar en la sección 17.7.

2.2. Preparación del *coating*

Antes de realizar los cultivos neuronales o de astrocitos, es necesario llevar a cabo un recubrimiento (o *coating*) con poli-D-lisina y laminina en la superficie de las placas donde se van a ser sembrados, de manera que facilite la correcta adhesión de estas células a la misma gracias a sus características funcionales. Este hecho se debe a que la

poli-D-lisina es un homopolímero de lisina sintético que permite la adhesión celular y facilita su crecimiento mediante la interacción de las cargas positivas del polímero y las cargas negativas de las células. Por otro lado, la laminina es la glicoproteína con mayor presencia en la lámina basal, donde promueve activamente la diferenciación celular, migración y adhesión. El procedimiento para realizar el *coating* se realiza en la campana de flujo laminar y es el siguiente:

1. Se descongela la poli-D-lisina y laminina en un baño a 37°C, donde también se atempera agua bidestilada y autoclavada.
2. Se calcula el volumen necesario de *coating*, teniendo en cuenta que ambas se utilizan a una concentración de 1 mg/ml y que se necesita 0,5 ml de *coating* por cada pocillo de una placa de 24 pocillos.
3. Se mezclan las cantidades calculadas en el volumen necesario de agua bidestilada y autoclavada según los pocillos a sembrar.
4. Se vierte 0,5 ml de *coating* a cada pocillo (volumen para placas de 24 pocillos) y se incuban durante un mínimo de dos horas en la incubadora a 37°C y 5% CO₂ (si para el experimento a realizar posteriormente es necesario, antes de verter el *coating*, se coloca un cubreobjetos redondo en el interior de cada pocillo).
5. Tras la incubación, se aspira el *coating* y se hace un lavado con agua bidestilada y autoclavada. Finalmente, se dejan secar las placas en el interior de la campana de flujo laminar con las tapas medio abiertas, hasta que se siembren las neuronas. Se recomienda realizar este paso durante el periodo de incubación con la solución de papaína de la preparación del cultivo neuronal (ver sección 2.3., paso 10).

2.3. Realización del cultivo a partir de cortezas cerebrales murinas

Para el cultivo de neuronas, a día 19-20 de gestación tanto de rata como de ratón, las hembras gestantes se sacrifican por asfixia mediante CO₂ en las instalaciones del animalario y se trasladan rápidamente al laboratorio. Allí, antes de realizar el procedimiento, se confirma la muerte del animal mediante la ausencia de reflejo de parpadeo o de respuesta al dolor mediante un estímulo de presión. A partir de entonces, con la ayuda de material quirúrgico se realiza la extracción de los embriones

con el fin de realizar cultivos neuronales primarios a partir de las cortezas cerebrales, según el siguiente procedimiento:

1. Se preparan 40 ml de medio de disección (ver sección. 2.1).
2. Se lava el material quirúrgico a utilizar con etanol 70%.
3. Se realiza una incisión en la parte abdominal del animal y se extraen los embriones uno a uno, retirándolos del saco amniótico y cortando el cordón umbilical. Inmediatamente se introducen en un tubo con 10 ml de solución de disección.

Para el cultivo de astrocitos, las crías a P0-P1 son trasladadas de las instalaciones del animalario al laboratorio, donde se sacrifican por decapitación. Los cultivos de astrocitos fueron realizados y mantenidos por la Dra. Raquel Larramona, integrante del grupo de investigación

Después de este punto, si los cultivos a realizar provienen de ratón, como el genotipo de los embriones puede ser $Mfn2^{lox/lox} UBC-CRE-ERT2^{+/-}$ o $Mfn2^{lox/lox} UBC-CRE-ERT2^{-/-}$, se debe realizar un genotipado previo para no mezclar hemisferios de distintos genotipos, y se sigue en el siguiente punto. Si por el contrario, provienen de rata, se sigue directamente en el punto 6, ya que no es necesario el genotipado.

4. Se separan los embriones/crías en distintos pocillos de una placa de 24, 12 o 6 pocillos con medio de disección (según la medida y número de embriones).
5. Se realiza la extracción de ADN y el genotipado (ver sección 1.2.). Mientras la PCR está en marcha, se recomienda preparar el gel de acrilamida para la electroforesis y continuar en el siguiente punto para tener las cortezas ya extraídas una vez haya acabado la genotipado y así optimizar tiempo.
6. Se colocan los embriones/crías en una placa de 35 mm con medio de disección bajo una lupa binocular, y se extraen los hemisferios cerebrales.
7. Se retira el cuerpo calloso, el hipocampo y las meninges, y se pasan las cortezas cerebrales a una nueva placa de 35 mm con medio de disección (en el caso de las cortezas de ratón, se separan en distintos pocillos numerados de una placa de 24 pocillos hasta saber el genotipo).

8. Con la ayuda de una pipeta de 10 ml, se pasan las cortezas a un tubo con base redondeada y se elimina toda la solución de disección que sea posible (en el caso de las cortezas de ratón, no se pasan las cortezas hasta saber el genotipo, y siempre se juntan en un mismo tubo las del mismo genotipo).
9. Se añaden al tubo 2 ml de solución de papaína (ver sección 2.1.) previamente atemperada a 37°C, y se incuba durante 20 minutos a 37°C. Se recomienda agitar manualmente un par de veces el tubo cada 5 minutos para asegurar que la papaína impregne todo el tejido y se disgregue correctamente.
10. Se retira la solución de papaína con cuidado de no aspirar el tejido, se vuelve a añadir 2ml más de solución de papaína y se vuelve a incubar 20 minutos a 37°C, agitando el tubo cada 5 minutos. Durante este periodo de incubación se recomienda realizar el lavado del *coating* (ver sección 2.2., paso 5).
11. Se retira la solución de papaína y se llevan a cabo dos lavados con 2 ml de medio de disección, eliminando siempre el máximo de medio posible sin aspirar el tejido.
12. Se realizan dos lavados con 2 ml de medio NBA (ver sección 2.1.), eliminando de nuevo el máximo de medio posible sin aspirar el tejido.
13. Se añaden 2 ml de medio NBA, y con una pipeta de 2 ml se realiza una disgregación mecánica pipeteando arriba y abajo una gran cantidad de veces (alrededor de 50).
14. Se añaden 2 ml de medio NBA y se deja que sedimenten los trozos de tejido no disgregados durante unos minutos.
15. Se aspira la parte superior del medio NBA, con mucho cuidado de no aspirar los tejidos no disgregados, y se pasa a otro tubo o botella estéril (en función de la cantidad necesaria).
16. Se repiten los pasos 13, 14 y 15.
17. Se repite de nuevo el paso 15, pero esta vez, después de la tercera disgregación mecánica, se aspiran directamente los 2 ml y se pasan a la botella. Es importante que después de esta tercera disgregación ya no sea visible ningún trozo de tejido no disgregado. En caso de haberlos, no se pasan a la botella.
18. En el tubo o botella estéril donde hay los 10 ml de medio con la suspensión celular, se añade el volumen necesario de medio OptiMEM (ver sección 2.1.),

teniendo en cuenta que por cada hemisferio cerebral de rata se requiere un volumen total de 6,5 ml y por cada corteza de ratón de 2,5 ml.

19. Se siembran 0,5 ml de la suspensión celular por pocillo (volumen para placas de 24 pocillos).
20. Las placas se meten en la incubadora durante 2 horas y media, a 37°C y 5% de CO₂, para permitir la adhesión de las neuronas a la placa.
21. Una vez pasado este tiempo, se retira el medio de los pocillos y se añade 1 ml de medio NBA por pocillo (volumen para placas de 24 pocillos), previamente atemperado a 37°C. En el caso de los cultivos de astrocitos, se añade DMEM 4,5 g/L suplementado, en vez de medio NBA.
22. Se vuelven a meter las placas en la incubadora en las mismas condiciones y se dejan crecer los cultivos, hasta que tengan que ser tratados con el inhibidor de la mitosis “AraC” (ver sección 2.4.), solo en el caso de las neuronas, y tamoxifeno (ver sección 2.5.). Después de la siembra, cada 4-5 días se le cambia el medio a los astrocitos por medio fresco.

2.4. Tratamiento con el inhibidor de la mitosis “AraC”

Con el objetivo de trabajar con cultivos neuronales lo más puros posible, los cultivos primarios de neuronas corticales se tratan con un análogo del nucleósido citidina llamado arabinósido de citosina (AraC), también conocido como citarabina. Este fármaco bloquea la función de la ADN polimerasa, por lo que interfiere la síntesis de ADN y por lo tanto, inhibe la mitosis. Generalmente se emplea como tratamiento contra diferentes tipos de cáncer, dado su capacidad de dificultar la multiplicación de células malignas. Dado que las neuronas no se multiplican, en cultivos de cortezas cerebrales se aprovecha su función inhibidora de la proliferación para impedir la proliferación de células no neuronales, como por ejemplo las células gliales. De esta forma, es posible obtener un cultivo con alta pureza de neuronas y que las respuestas observadas tras realizar los experimentos provengan mayoritariamente de las neuronas, sin que queden enmascaradas por otros tipos de células no neuronales que hayan proliferado más.

El tratamiento con AraC (C6645; Sigma) se realiza a DIV4 tras la transfección, si la hay, siguiendo los siguientes pasos:

1. Se añade en un tubo 1 ml de medio NBA por pocillo sembrado.
2. Se añade AraC a concentración final de 1,2 mM, teniendo en cuenta que el stock de AraC se prepara una concentración de 0,24 M.
3. Se retira el medio utilizado durante la incubación de la transfección, y se pasa 1 ml de medio NBA con AraC por pocillo.

En el caso de los cultivos sin transfectar, se realiza igualmente a DIV4, pero en vez de retirar el mililitro de medio NBA que ya hay en los pocillos, se mantiene. El tratamiento con AraC se suele realizar junto con el tratamiento con tamoxifeno (ver sección 2.5.), si lo hay.

2.5. Tratamiento con tamoxifeno

En los cultivos primarios de neuronas corticales de ratón o de astrocitos, dado que los ratones transgénicos utilizados como modelo experimental presentan el sistema de recombinación “Cre-Lox” inducible por tamoxifeno (ver sección 1.2.), es necesaria la aplicación de tamoxifeno para obtener la recombinación de las regiones “Lox” y consiguiente supresión del gen al cual flanquean, en este caso Mitofusina2.

El tratamiento se realiza con (Z)-4-hidroxitamoxifeno (H7904; Sigma) a la mitad de los pocillos sembrados, siendo los pocillos no tratados los que se utilizan como condiciones control.

En neuronas, el tratamiento se lleva a cabo a DIV4 justo tras la transfección durante 3 días, si la hay, mediante el siguiente proceso:

1. Se añade en un tubo 1 ml de medio NBA por pocillo a tratar.
2. Se añade tamoxifeno a una concentración final de 1 μ M, teniendo en cuenta que el stock de tamoxifeno se prepara a una concentración de 12,5 mM.
3. Se retira el medio utilizado durante la incubación de la transfección, y se pasa 1 ml de medio NBA con tamoxifeno por pocillo.

En el caso de los cultivos sin transfectar, se realiza igualmente a DIV4 durante 3 días, pero en vez de retirar el mililitro de medio NBA que ya hay en los pocillos, se mantiene. El tratamiento con tamoxifeno se realiza junto con el tratamiento con AraC (ver sección 2.4.).

En astrocitos, el tratamiento se lleva a cabo después de 10-12 días de la siembra, de la misma manera que las neuronas, pero usando DMEM 4,5 g/L suplementado, en vez de NBA.

3. Cultivos de líneas celulares

Del mismo modo que los cultivos primarios permiten una mayor sencillez para el estudio de procesos celulares y moleculares que los modelos animales, las líneas celulares continuas presentan aún más facilidades técnicas que los otros dos modelos, debido al hecho de que las células se dividen continuamente. Por lo tanto, a partir de un solo cultivo, se pueden obtener gran cantidad de células de manera continua para realizar diferentes aproximaciones a la vez, sin tener que depender de una fuente para obtener las células, tal como pasa en los cultivos primarios. Además, aparte de poder afinar aún más la reproducibilidad y variabilidad entre experimentos al provenir de la misma línea celular, las células se pueden congelar y conservar así durante largos periodos de tiempo, de manera que cuando se descongelan se mantiene con las mismas características que antes de la congelación. No obstante también presentan desventajas, como la posible aparición de inestabilidad genética, y aunque son útiles para describir procesos celulares y moleculares de manera general, no presentan tanta aplicabilidad fisiológica en comparación con cultivos de ciertos tipos celulares en concreto, como por ejemplo cultivos neuronales.

Para la realización de este trabajo, se han empleado diferentes tipos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) (Chen et al. 2003). Estos fibroblastos consisten en una línea *wild-type* (WT), una línea *knockout* para el gen de Mitofusina1 (Mfn1KO), una línea *knockout* para el gen de Mitofusina2 (Mfn2KO) y una línea doble-*knockout* para los genes de Mitofusina1 y Mitofusina2 (DKO).

Toda manipulación de estas líneas celulares se ha realizado en condiciones de esterilidad en cabinas de flujo laminar vertical, después de una previa descontaminación mediante radiación UV y etanol al 70%, y con material autoclavado.

3.1. Preparación de medios y soluciones

Para la manipulación de las líneas celulares, se usan medios, soluciones o suplementos estériles, ya sea de fábrica o mediante autoclavado o filtrado en membrana de 0,22 μm de poro tras su preparación en el laboratorio. Los medios y soluciones utilizados durante el trabajo con líneas celulares son los siguientes:

- Medio DMEM 4,5 g/l glucosa: A una botella de DMEM 4,5 g/l glucosa se añade 56,8 ml FBS, 5,6 ml P/E y 5,6 ml L-glutamina.
- Solución de congelación: A un tubo con FBS se añade DMSO hasta que alcance el 10% en volumen. Se prepara cada vez que se necesita y se mantiene siempre en hielo.
- Solución de tripsina: Se usó la solución comercial Tripsina+EDTA 0,25% de Sigma (T4049).
- Solución HBSS: A 97,22 mL de HBSS (Gibco, 14025-050) se añade 1,78 mL glucosa y 1 mL HEPES.
- Solución SGG (sin calcio, magnesio ni rojo fenol): Para 1 L, se añade en agua milli-Q 22,28 ml NaCl 5 M, 29,2 ml NaHCO_3 7,5%, 1,764 ml KCl 3 M, 10 ml HEPES 1 M, 1 ml glicina 1 M, 12 ml glucosa 2,5 M y 5 ml piruvato de sodio.

El medio DMEM 4,5 g/l glucosa se conserva a 4°C después de su preparación, hasta aproximadamente un mes como máximo, cuando se observa cambios en el color rosáceo a causa de cambios en el pH, momento en el cual se elimina. La solución de tripsina y FBS se conservan a -20°C. Antes de aplicarlos sobre los cultivos, se aatemperan siempre a 37°C para evitar someterlos a estrés térmico, y en el caso de la solución de tripsina, para que la enzima funcione de manera óptima.

Los detalles de los medios comerciales utilizados y suplementos añadidos para la preparación de los medios y soluciones descritos se pueden consultar en la sección 17.7.

3.2. Descongelación de células

Antes de su utilización, las líneas celulares se mantienen congeladas en criotubos dentro de tanques de nitrógeno líquido a -196°C cuando se desean conservar durante periodos largos (meses-años), o en ultracongeladores a -80°C durante periodos cortos (semanas-meses). Por ello, para trabajar con ellas primero se deberá realizar la descongelación de las mismas, la cual debe ser realizada de forma rápida, ya que el DMSO utilizado como crio-protector es tóxico a temperatura ambiente. Para ello, se siguen los siguientes pasos:

1. Se atempera el medio DMEM 4,5 g/l glucosa.
2. Se saca el criotubo con las células a descongelar del tanque de nitrógeno líquido o del ultracongelador y se traslada hasta el laboratorio en hielo.
3. Se introduce el criotubo en el baño a 37°C durante periodos de pocos segundos hasta que se ha descongelado casi por completo el contenido.
4. Antes de que se descongele del todo, se añade 1 ml medio DMEM 4,5 g/l glucosa al criotubo.
5. Se añade el contenido del criotubo a una botella T-75 con 10 ml de medio DMEM 4,5 g/l glucosa.
6. Se deja la botella T-75 en la incubadora a 37°C y 5% CO_2
7. Después de 3 horas, se comprueba con el microscopio que las células se han adherido. En caso afirmativo, se retira el medio de la botella T-75, se reemplazan por otros 12 ml de medio DMEM 4,5 g/l glucosa y se vuelve a dejar la botella de nuevo en la incubadora.

3.3. Mantenimiento y pase de líneas celulares

Una vez las células están descongeladas y se procede a trabajar con ellas, es necesario ir manteniendo este cultivo en división para ir obteniendo continuamente células con las cuales realizar los experimentos. Para ello, una pequeña parte de las células se van pasando continuamente de botella T-75 en botella T-75 para amplificar el cultivo, y paralelamente se van sembrando las placas en las cuales se realizaran los experimentos con las células restantes. Para ello, se siguen los siguientes pasos:

1. Se atempera medio DMEM 4,5 g/l glucosa, solución PBS 1x y solución de tripsina.
2. Se aspira el medio que hay en la botella T-75 con una pipeta pasteur acoplada a un sistema de aspiración.
3. Se realiza un lavado con 10 ml PBS 1x, sin tirarlo directamente sobre la superficie donde están las células, sino por las paredes, y se agita suavemente la botella para recubrir toda la superficie.
4. Se aspira el PBS 1x y se añade 2 ml de solución de tripsina, agitando la botella para que recubra toda la superficie de la placa.
5. Se deja la botella en la incubadora a 37°C durante un par de minutos.
6. Se observa en el microscopio que las células se han despegado. En caso contrario, se puede ayudar agitando la botella más vigorosamente o dando unos golpecitos a la superficie de la botella. Es importante no alargar demasiado la incubación con tripsina, ya que también puede afectar a la viabilidad de las células.
7. Se añade 10 ml de medio DMEM 4,5 g/l glucosa y se pipetea varias veces para desagregar las células que forman cúmulos.
8. Se toma 1 ml de la suspensión celular y se pone en un eppendorf.
9. Se realiza el conteo celular (ver sección 14.1.).
10. Para sembrar las placas donde se realizarán los experimentos, se toma el volumen necesario de la solución celular según las células que queramos sembrar, teniendo en cuenta que para placas de 24 pocillos se añade 1 ml/pocillo, para placas de 6 pocillos 2,5 ml/pocillo, para placas de 96 pocillos 150 µl/pocillo y en las placas de 35mm con cubreobjetos para microscopía 1,5 ml/placa.
11. Para sembrar nuevas botellas T-75 para mantener la línea celular, se toma entre 0,2 y 1 ml, según la cantidad de células que haya, de la suspensión celular y se pasa a la nueva botella T-75, donde se añadirá DMEM 4,5 g/l glucosa hasta 12 ml.
12. Se deja la botella T-75 en la incubadora a 37°C y 5% CO₂.

3.4. Congelación de células

Después de establecer o descongelar una línea celular y con el objetivo de expandirla, poder trabajar con ella en un futuro partiendo de unas células a bajo número de pases y por lo tanto, intentar trabajar siempre con una línea con las mismas características genéticas, las líneas celulares se mantienen congeladas largas temporadas en tanques de nitrógeno líquido. La congelación, a diferencia de la descongelación, se debe realizar gradualmente y no de manera rápida, para permitir la deshidratación de las células y evitar la formación de cristales de hielo intracelulares, pero no tan lenta como para provocar daños a la célula debido a la excesiva deshidratación. El proceso se realiza de la siguiente manera:

1. Se prepara la solución de congelación (ver sección 3.1.) y se deja en hielo hasta que se enfríe.
2. Se tripsinizan las células (ver sección 3.3.).
3. La suspensión resultante después de añadir DMEM 4,5 g/l glucosa, se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos.
4. Se elimina el sobrenadante.
5. Se resuspende el pellet con solución de congelación y se mantiene en hielo.
6. Se reparte la suspensión en diferentes criotubos, a razón de 1-1,5 ml/tubo. Si se requiere congelar un número concreto de células, la concentración celular de la suspensión se debe cuantificar en una cámara de Neubauer y después pasar a cada criotubo el volumen calculado.
7. Se colocan los criotubos en un *cooler* recubierto de propanol y se introducen en un ultracongelador a -80°C. Este *cooler* ayudará a que la congelación se realice de manera gradual.
8. Si el objetivo de la congelación es mantener las células congeladas durante un periodo largo de tiempo (meses-años), a partir de las 24 horas se traspasan a tanques de nitrógeno líquido a -196°C.

4. Técnicas de manipulación de ADN

En este trabajo se han realizado gran cantidad de experimentos en los cuales se han utilizado diferentes plásmidos (ver sección 17.3.) que han sido transfectados a las células, con el objetivo de que estas expresaran las proteínas para las cuales codificaban y observar su efecto. Algunos de estos han sido obtenidos de depósitos, comprados o cedidos amablemente por otros investigadores, y por lo tanto, solo ha sido necesaria su amplificación en bacterias, mientras que otros han sido generados a raíz de esta tesis. Para ello, se han tenido que llevar a cabo diferentes técnicas de manipulación y modificación de ADN, trabajando siempre con material esterilizado por autoclave para evitar contaminaciones con ADN ajeno, por otras bacterias o DNAsas.

4.1. Transformación de bacterias competentes

La transformación bacteriana consiste en la incorporación por parte de células procariotas de ADN exógeno, que en este caso son los plásmidos de interés para este estudio. De esta forma, las bacterias amplifican extensamente el plásmido incorporado gracias a su maquinaria de replicación ADN propia, hecho que, tras su purificación, proporcionará disponer de gran cantidad de plásmido para transfectarlo posteriormente a las células de estudio.

Las bacterias competentes utilizadas para este trabajo pertenecen a la cepa JM109 *Escherichia Coli*, y su manipulación se lleva a cabo cerca de un mechero Bunsen, proporcionando de esta forma un área de trabajo estéril. La transformación de las mismas se realiza por choque térmico de la siguiente manera:

1. Se añade en un eppendorf estéril 40 μ l de bacterias competentes junto con el plásmido con el que se quieren transformar. Habitualmente se utilizan cantidades de plásmido entre 10-50 ng, diluidos en un volumen entre 1-10 μ l de agua Mili-Q. Cuando se transforma con productos de ligación (ver sección 4.6.), se añade todo el volumen de la reacción (10 μ l).
2. Se agita suavemente para mezclar el contenido y se mantiene en hielo durante 30 minutos, momento en el cual el plásmido se adhiere a la superficie de la bacteria.

3. Se incuba a 42°C durante 1 minuto.
4. Rápidamente se devuelven las bacterias al hielo y se mantienen 2 minutos.
5. Se añade 1 ml de medio LB y se incuba 1 hora a 37°C en agitación, momento en el cual las bacterias que hayan incorporado el plásmido empiezan a expresar la resistencia al antibiótico para su posterior selección.
6. Se siembran 80 µl de bacterias transformadas en una placa de LB-agar con el antibiótico pertinente, según la resistencia que exprese el plásmido transformado. Si es necesario, se puede centrifugar a 1000 rpm durante 4 minutos para concentrar la suspensión bacteriana.
7. Se incuba la placa sembrada a 37°C durante 16 horas aproximadamente.
8. Se toma una o varias colonias con una punta de pipeta estéril y se tira la punta a un recipiente estéril con medio LB (en un volumen u otro de medio según el kit que se utilice para la extracción y purificación del plásmido, ver sección 4.2.) y el antibiótico pertinente. Idealmente se seleccionan colonias separadas para así evitar tomar colonias satélite, bacterias sin el plásmido de interés pero que han crecido aprovechando la resistencia producida por las colonias cercanas.
9. Se deja el matraz agitando a 37°C hasta el día siguiente, para que crezca el número de bacterias transformadas y así obtener más cantidad de plásmido en la posterior purificación (ver sección 4.2.).
10. Después de la incubación y antes de proceder a la purificación, se toman 850 µl de suspensión bacteriana, se mezclan con 150 µl de glicerol en un eppendorf y se congelan en un ultracongelador a -80°C. De esta forma, se mantienen bacterias transformadas durante largos periodos de tiempo (meses-años) por si en un futuro es necesario amplificar y purificar de nuevo el plásmido de interés.

4.2. Extracción y purificación de ADN plasmídico

Una vez se han transformado las bacterias con el plásmido de interés y éstas lo han amplificado, se procede a extraer el plásmido y purificarlo para su posterior uso. Este proceso se lleva a cabo utilizando kits comerciales con protocolos establecidos y optimizados para ello. En todos ellos, el plásmido se purifica finalmente en 0,5 ml de agua libre de nucleasas, y según la cantidad de plásmido que se necesite extraer y purificar, se optará por utilizar uno u otro. Además, también variará el volumen de LB

con el antibiótico pertinente donde crecen previamente las bacterias desde el día anterior a 37°C en agitación, según el kit a utilizar.

Miniprep

El kit utilizado en este caso es el *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma). Con este kit se obtienen pequeñas cantidades de plásmido (0,1-0,2 µg/µl) y se suele utilizar cuando se está caracterizando o manipulando el plásmido. Las bacterias a partir las cuales se extrae el plásmido crecen previamente en 5ml de medio LB con antibiótico o/n.

Midiprep

Para esta opción se utiliza el kit *HiSpeed Plasmid Midi Kit* (Qiagen). Con este kit se obtienen cantidades medias de plásmido (0,3-0,5 µg/µl) y se suele utilizar para obtener plásmido para transfectar células eucariotas. Las bacterias a partir las cuales se extrae el plásmido crecen previamente en 50ml de medio LB con antibiótico o/n.

Maxiprep

Para realizar Maxipreps se utiliza el kit *HiSpeed Plasmid Maxi Kit* (Qiagen). Con este kit se obtienen grandes cantidades de plásmido (1-1,2 µg/µl) y se suele utilizar para obtener plásmidos muy utilizados en las transfecciones de células eucariotas o para trabajar con virus adenoasociados, aunque éste no es el caso del presente trabajo. Las bacterias a partir las cuales se extrae el plásmido crecen previamente en 5ml de medio LB para iniciar el crecimiento durante 5-6 horas y luego se pasan a 200ml de medio LB con antibiótico o/n.

4.3. Cuantificación de ADN

Cuando se trabaja manipulando material genético, ya sea para transfección de células eucariotas o para clonar o mutar plásmidos, entre otros procedimientos, idealmente se debe tener conocimiento de cuanto material genético se está manejando para cada procedimiento realizado. De esta forma los experimentos son más trazables y reproducibles, y las probabilidades de tener éxito en las distintas reacciones aumentan.

Para cuantificar el ADN, se ha utilizado un lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN) y la placa NanoQuant (TECAN) siguiendo los siguientes pasos:

1. Se lavan los micropocillos de la placa NanoQuant añadiendo 2 μ l de agua libre de nucleasas. Después de cada paso, se secan con delicadeza los micropocillos. Es importante hacerlo de este modo para no dañar la superficie de cristal a través de la cual se realiza la lectura.
2. Se añade 1 μ l de agua libre de nucleasas por micropocillo y se realiza la medida del “blanco”. Una vez hecha, se seca de nuevo con suavidad.
3. Se añade 1 μ l del plásmido de interés por micropocillo y se realiza la medida de “cuantificación de ADN”, el cual mide absorbancia a A260 y la ratio entre las absorbancias A260/A280 para calcular la concentración de plásmido y la pureza del mismo, respectivamente.
4. Se lavan los micropocillos con 2 μ l de agua libre de nucleasas.
5. Se lavan los micropocillos con etanol 70%.

Este procedimiento también es aplicable a la cuantificación de ARN, siguiendo los mismos pasos pero utilizando la opción pertinente del software del lector de placas (en el paso 3).

4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”)

La PCR es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es la obtención de gran cantidad de copias de un fragmento de ADN. La enzima encargada de llevar a cabo esta reacción es la Taq ADN polimerasa, una polimerasa termoestable capaz de sintetizar un fragmento de cadena complementaria de DNA que actúe como molde, a partir de ADN cebador o *primers* (ver sección 17.4.). Estas secuencias cebadoras son complementarias a las hebras del ADN molde y delimitan el fragmento de ADN que se quiere amplificar, siendo las secuencias cebadoras los extremos del mismo. Para este trabajo se ha utilizado la *GoTaq® G2 Green Master Mix* (Promega), la cual ya contiene una mezcla de la polimerasa termoestable con todos los elementos necesarios para la reacción, como son desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) o $MgCl_2$, entre otros. Para un volumen de 25 μ l por muestra, se prepara en hielo los siguientes volúmenes de reactivos en tubos de 0,2 ml especiales para PCR y se programa el termociclador de la

siguiente manera para que realice las distintas fases de la reacción, ajustando la temperatura, tiempo y número de ciclos adecuados:

Componente	Cantidad	Temperatura	Tiempo	Nº ciclos	Fase
<i>Gotaq Green MM 2X</i>	12,5µl	94°C	5min	1	Desnaturalización inicial del ADN
Agua libre de DNAsas	9,5µl	94°C	30s		Desnaturalización ADN
<i>Forward primer 10µM</i>	1µl	55°C *	40s	30	Hibridación de <i>primers</i>
<i>Reverse primer 10µM</i>	1µl	72°C **	30s		Elongación de la cadena
DNA	1µl	72°C	5min	1	Elongación final
		4°C	-	-	Conservación muestras

* La temperatura puede variar en función de la temperatura de fusión de los *primers*.

** La temperatura puede variar en función del tamaño del producto que se quiera amplificar (1 Kb/min).

4.5. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN en base a su tamaño. Esta técnica se basa en aplicar una corriente eléctrica en una celda electrolítica donde se coloca el gel de agarosa y aprovechar la carga negativa propia del ADN para que este migre hacia el ánodo o polo positivo. El ADN puede plegarse de forma compleja y adoptar estructuras terciarias que complican la migración a través del gel, no obstante, se utilizan compuestos que despliegan estas conformaciones, permitiendo que la migración dependa únicamente del tamaño del fragmento. Además, la concentración del gel de agarosa también juega un papel clave en la electroforesis, ya que a mayor concentración, se generarán poros más pequeños, lo que permitirá separar mejor fragmentos pequeños entre sí, y viceversa.

Para este trabajo, generalmente se han utilizado geles de agarosa al 1% (p/v), los cuales son recomendados para separar fragmentos de 0,5 Kb a 10 Kb. Para su preparación y carga de las muestras, se han seguido los siguientes pasos:

1. Para un gel de 100 ml, se vierten 100 ml de tampón TAE 1X en un Erlenmeyer de 150 ml y se añade la cantidad necesaria de agarosa según el porcentaje que se requiera. Por ejemplo, para un gel al 1%, se añade 1 g.

2. Se calienta en un microondas hasta que se disuelva la agarosa, sin que la solución llegue a hervir, y se saca del microondas con ayuda de un guante aislante térmico.
3. Mientras se enfría la solución, se prepara el molde donde se va a verter la solución para que polimerice.
4. Para ayudar a enfriar la solución, se moja la superficie externa del Erlenmeyer con agua fría hasta que el cristal se puede tocar sin quemarse, pero sin que se enfríe tanto como para que polimerice la agarosa.
5. Se añaden 4 μ l de bromuro de etidio 5 g/l, se mezcla bien por agitación y se vierte en el molde, colocando después el peine para generar los pocillos donde cargar las muestras.
6. Se deja enfriar hasta que polimerice.
7. Se coloca el gel ya polimerizado en la cubeta del equipo de electroforesis horizontal y se añade TAE 1X hasta que el gel queda todo cubierto.
8. Se preparan las muestras de ADN mezclándolas con el tampón de carga 6X (concentración final 1X). A veces este paso no es necesario, como por ejemplo cuando se utilizan muestras que provienen de una PCR realizada con *GoTaq[®] G2 Green*, ya que el tampón de carga va incorporado en el propio tampón que se utiliza para realizar la PCR.
9. Se prepara el marcador de peso molecular mezclando 1 μ l de DNA *ladder* (Promega), 9 μ l de agua libre de nucleasas y 2 μ l de tampón de carga 6X.
10. Se cargan las muestras y el marcador de peso molecular (1 Kb *DNA Ladder*) en el interior de los pocillos (10-25 μ l por pocillo).
11. Se tapa la cubeta con la tapa, conectando los electrodos a la fuente de electroforesis, y se aplica un voltaje de 75-100 V.
12. Se deja correr el ADN por el gel, sin que las bandas de ADN lleguen a salirse del mismo.
13. Se traslada el gel a una cámara oscura y se coloca sobre un transiluminador de rayos UV
14. Se observan las bandas a través de una placa protectora o se fotografía el gel mediante un sistema de obtención de imágenes acoplado al transiluminador.

Recuperación de fragmentos de ADN

Una vez realizada la electroforesis, sobre todo durante procesos de clonación de ADN (ver sección 4.6.), es probable que se desee recuperar alguna de las bandas que han corrido por el gel, para realizar una posterior ligación.

Para ello, después de realizar todos los pasos de la electroforesis y cuando se está observando las bandas en el transiluminador, con una cuchilla se recorta un pequeño rectángulo de gel de agarosa en el punto donde se encuentra la banda de interés, y se guarda el trozo de gel en un eppendorf. En estos casos, es importante evitar una exposición prolongada del ADN que se quiere recuperar a los rayos UV del transiluminador, para evitar que se produzcan daños en el ADN. Por lo tanto, el proceso de observación de la banda y recorte del gel, se ha de realizar lo más rápido posible. Finalmente, para recuperar el fragmento de ADN de interés del trozo de gel, se ha utilizado el kit *Wizard® SV Gel and Clean-Up System* (Promega), siguiendo el protocolo incluido en el mismo. El producto final de este proceso será el fragmento de ADN de interés disuelto en 50 μ l de agua libre de nucleasas, listo para usar en posteriores procesos.

4.6. Clonación de ADN

La clonación de ADN es una técnica de biología molecular que consiste en insertar un fragmento de ADN, generalmente un gen de interés, a un plásmido, que se utiliza como vector de clonación, con el objetivo final de producir gran cantidad de copias de este fragmento. La estrategia más utilizada para ello es el clonaje de productos de PCR. A continuación, se detallan los procesos seguidos para la inserción del fragmento de ADN de interés al plásmido, ya que el procedimiento para producir copias del fragmento en gran cantidad consiste en la transformación de bacterias competentes (ver sección 4.1.) con el plásmido generado y su posterior extracción y purificación (ver sección 4.2.):

Diseño de primers y PCR

El primer paso para insertar el fragmento de ADN de interés al plásmido, es la amplificación del mismo mediante una PCR (ver sección 4.4.). Para ello, es esencial que

los *primers* utilizados cumplan tres características, con la finalidad de permitir realizar de manera óptima los pasos posteriores de la clonación:

1. Debe contener una secuencia de hibridación (18-21 pb), es decir, una región que sea complementaria a los extremos de la secuencia a amplificar.
2. Debe contener una diana de restricción (6-8 pb), para poder realizar posteriormente el proceso de digestión (ver sub-apartado correspondiente). Cuando se seleccione la diana de restricción es importante tener en cuenta las dianas de restricción existentes en el plásmido donde se insertará el fragmento. Preferiblemente se utilizaran enzimas que generen extremos cohesivos, para facilitar la posterior ligación (ver sub-apartado correspondiente).
3. Debe contener una secuencia cabecera (3-6 pb), que consiste en unos pocos nucleótidos extra añadidos al inicio del primer, para facilitar la posterior digestión de la secuencia amplificada (ver sub-apartado correspondiente).

Aislamiento del producto

El producto de la PCR se carga en un gel de agarosa y se realiza una electroforesis (ver sección 4.5.). Posteriormente, se recupera el fragmento de ADN amplificado en la PCR (ver sección 4.5.).

Digestión

Una vez amplificado el fragmento de ADN de interés, se procede a digerir tanto el fragmento de ADN amplificado como el vector plasmídico al cual será insertado. Idealmente, este proceso se realiza con dos enzimas de restricción diferentes, una para cada extremo del fragmento, que generen extremos cohesivos, para después facilitar la ligación. Cada enzima de restricción tiene un tampón de reacción en el cual su actividad es óptima, por lo que es importante a la hora de planificar qué enzimas utilizar, escoger aquellas que compartan un tampón de reacción en el cual su actividad sea óptima, o si no es posible, lo más eficiente posible. Generalmente se utiliza 1U de enzima de restricción por reacción, pero si una de las enzimas no tiene una actividad óptima con el tampón de reacción utilizado, se utiliza entre 1,5 y 2 U de enzima para compensar el déficit de actividad. No obstante, hay que tener en cuenta que el

volumen de enzima no puede superar el 10% del volumen de reacción, ya que las enzimas están disueltas en glicerol, el cual es capaz de inhibir la reacción enzimática a concentraciones superiores al 10%.

La digestión tanto del fragmento amplificado como del plásmido se realiza generalmente a 37°C (aunque puede depender según la enzima de restricción) durante 1 hora, utilizando los volúmenes que se detallan a continuación:

Componente	Cantidad
Inserto	40µl
Enzima restricción 1	1-2µl
Enzima restricción 2	1-2µl
Tampón de reacción	5µl
Agua libre de DNAsas	Hasta 50µl

Componente	Cantidad
Plásmido de clonaje	1µg
Enzima restricción 1	1-2µl
Enzima restricción 2	1-2µl
Tampón de reacción	5µl
Agua libre de DNAsas	Hasta 50µl

Después de realizar la digestión, el ADN digerido se purifica con el kit comercial *Wizard® SV Gel and Clean-Up System* (Promega), siguiendo el protocolo incluido en el mismo.

Ligación

El último paso para realizar la clonación de ADN, será insertar el fragmento de interés al vector plasmídico, para que pasen a ser parte de una misma construcción de ADN.

La ligación del fragmento amplificado con el plásmido se realiza a 4°C de temperatura durante toda la noche, utilizando la ligasa del bacteriófago T4 (Promega) y los volúmenes que se detallan a continuación:

Componente	Cantidad
Inserto	7µl
Plásmido digerido	1µl
Tampón de reacción 10X	1µl
T4 DNA ligasa	1µl

Posteriormente, se transforman bacterias competentes con el producto de la ligación (ver sección 4.1.), se selecciona una colonia y se extrae y purifica el plásmido mediante una *MiniPrep* (ver sección 4.2.).

Hay que tener en cuenta que durante la ligación el plásmido podría haber religado consigo mismo, o según la combinación de enzimas de restricción empleada, la ligación podría haber dado lugar a una construcción aberrante. Por eso, es importante, que tras obtener el plásmido purificado, se compruebe que la construcción de DNA generada es la deseada, ya sea con un análisis por restricción, por secuenciación o ambas técnicas (ver sección 4.8.).

4.7. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida es una técnica de biología molecular basada en la PCR que tiene como objetivo crear mutaciones en un lugar determinado de una cadena de ADN. Para ello, se diseñan *primers* que hibridan con la cadena simple de ADN en el lugar deseado a realizar la mutación, y que contienen dicha mutación, ya sea un cambio de nucleótido o incluso deleciones o inserciones. Por lo tanto, al realizar la PCR, la ADN polimerasa introducirá la mutación al sintetizar las nuevas cadenas a partir de los *primers*. Aunque los productos amplificados serán ampliamente mayoritarios a las cadenas de ADN iniciales, que no contienen la mutación, debido a que se trata de una amplificación exponencial, el producto de la PCR se trata con la enzima de restricción DpnI. Esta enzima es capaz de digerir únicamente el ADN metilado, por lo que las cadenas sintetizadas *in vitro* durante la amplificación, y que contienen la mutación, no serán digeridas. De esta manera, se podrá asegurar que todas las cadenas de ADN obtenidas tras el procedimiento, contienen la mutación deseada.

Para realizar mutagénesis dirigida, se ha utilizado el kit *Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England Biolabs), siguiendo el protocolo detallado en el propio kit, el cual se divide en dos fases:

1. Preparación de los reactivos y realización de la PCR.
2. Preparación de los reactivos y tratamiento con DpnI.

Posteriormente, se transforman bacterias competentes (ver sección 4.1.) con el producto obtenido y se extrae y purifica el plásmido mediante una MiniPrep (ver sección 4.2.).

Del mismo modo que con la clonación de ADN, después de realizar la mutagénesis dirigida, se debe comprobar si el procedimiento ha sido exitoso y realmente se ha introducido la mutación de interés al ADN inicial. Si es posible, como por ejemplo en mutaciones para introducir dianas de restricción, se puede realizar un análisis por restricción, pero la mayoría de veces la única forma de asegurarlo es mediante una secuenciación (ver sección 4.8.).

4.8. Comprobación de secuencias de ADN

Después de realizar técnicas de manipulación de ADN tales como la clonación de ADN o la mutagénesis dirigida, en las cuales el material genético producido es distinto al de partida, es necesario comprobar si las técnicas utilizadas han funcionado y se ha generado la construcción de ADN deseada. Para ello, se pueden llevar a cabo dos estrategias distintas.

Análisis por restricción

Esta primera técnica aprovecha las dianas de restricción presentes en el plásmido para llevar a cabo una digestión que genere un patrón único al correr los fragmentos en un gel de agarosa. Para ello, se debe escoger dianas que al ser digeridas sean capaces de generar fragmentos de mayor o menor tamaño, o un número distinto de fragmentos, en función de si la manipulación de ADN previa ha funcionado o no. Un ejemplo claro es en el caso de la clonación de ADN, en la cual se escoge una diana que se encuentre en el fragmento clonado y otra en el plásmido utilizado como vector. De esta manera, en función de si el fragmento se ha clonado o no, se observa en el gel de agarosa dos bandas o una, respectivamente.

Por lo tanto, se realiza una digestión (ver sección 4.6.) seguida de una electroforesis en gel de agarosa (ver sección 4.5.).

Secuenciación

Dependiendo del tipo de modificación se haya realizado al ADN, como por ejemplo mutaciones dirigidas, un análisis por restricción no es útil. En este caso, para comprobar que la modificación ha sido realizada, se debe llevar a cabo una

secuenciación. Este método permite determinar la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN a partir de un cebador y nucleótidos marcados, utilizando la técnica de la PCR.

Para ello se utiliza el kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), siguiendo las especificaciones del fabricante. El producto obtenido se envía al servicio de Genómica de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona, donde es analizado y procesado.

4.9. Transfección celular transitoria

La transfección celular transitoria consiste en la introducción de material genético externo, generalmente mediante el uso de plásmidos, en células eucariotas, con el objetivo de producir una proteína durante un tiempo determinado y estudiar su funcionalidad en dichas células. No obstante, en algún caso también se ha transfectado ARN de interferencia (siRNA), para silenciar la expresión de proteínas. Cuando se lleva a cabo esta técnica, no todas las células incorporan el plásmido o siRNA, por lo que para determinar qué células lo han hecho y por tanto, están produciendo o silenciando la proteína a estudiar, generalmente se transfecta también un segundo plásmido que contiene un gen reportero, detectable por fluorescencia.

El método usado para realizar transfecciones celulares transitorias durante este estudio es la lipofección, la cual se basa en la generación de liposomas. Estos liposomas son vesículas esféricas en forma de bicapa lipídica compuestas por fosfolípidos catiónicos, lo cual permite al ADN unirse mediante sus cargas, y que éste sea interiorizado en las vesículas, de manera que cuando el liposoma se une a la membrana plasmática de la célula eucariota por endocitosis, el ADN pasa a su interior. Para ello, se ha utilizado el reactivo comercial Lipofectamine™2000 (Invitrogen).

Transfección de líneas celulares

Para la transfección de líneas celulares se ha seguido el siguiente procedimiento bajo condiciones de esterilidad:

1. Se prepara y rotula un tubo de 15 ml por condición a transfectar.

2. Se añade en cada tubo 0,5 ml por pocillo de medio DMEM sin suplementar (sin suero, ni glutamina, ni antibióticos) atemperado previamente a 37°C.
3. Se añade el volumen pertinente de plásmido (máximo 1 µg* total para cada pocillo) o siRNA (25 ng* para cada pocillo) a cada tubo.
4. Se añade 3 µl* de LipofectamineTM2000 por pocillo a cada tubo.
5. Se mezcla el contenido de los tubos y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Tras la incubación, se mezcla de nuevo y se reparten 0,5 ml a cada uno de los pocillos correspondientes (donde se encuentran las células a transfectar en 1 ml de medio DMEM suplementado).
7. Se incuba durante 4 horas en la incubadora a 37°C y 5% CO₂.
8. Tras la incubación, se aspira todo el contenido de los pocillos y se reemplaza por medio DMEM suplementado, atemperado previamente a 37°C, y se colocan las células de nuevo en la incubadora hasta su uso, tras 48 horas de la transfección.

*Las cantidades especificadas se utilizan para transfecciones en placas de 24 pocillos. Para placas de 6 pocillos, se escalan las cantidades a la superficie del pocillo, es decir, se multiplican por 3.

Transfección de cultivos neuronales

Para la transfección de cultivos primarios neuronales se ha seguido el siguiente procedimiento bajo condiciones de esterilidad:

1. Dos horas antes de la transfección, se cambia el medio donde se encuentran las neuronas (NBA suplementado) por medio TM_{ITS}.
2. Tras las dos horas, en un eppendorf (por condición) se prepara la solución con el ADN a transfectar, añadiendo 33 µl de medio TM_{ITS} (de la propia placa) y hasta un máximo de 0,7 µg de ADN, por pocillo a transfectar.
3. En otro eppendorf, se prepara la solución de LipofectamineTM2000, añadiendo 33 µl de medio TM_{ITS} (de la propia placa) y 0,35 µl de LipofectamineTM2000, por pocillo a transfectar.

4. Se añaden 33 μ l por pocillo de la solución de LipofectamineTM2000 a la solución de ADN y se mezcla.
5. Se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Se añaden 285 μ l por pocillo a la mezcla de LipofectamineTM2000 y ADN y se mezcla de nuevo.
7. Se aspira el contenido de los pocillos donde se encuentran las neuronas y se añade 333 μ l de la mezcla anterior.
8. Se incuba durante 2 horas y media en la incubadora a 37°C y 5% CO₂.
9. Se aspira el contenido de los pocillos y se substituye por medio TM_{ITS} nuevo, previamente atemperado, y se devuelven a la incubadora hasta su uso, tras 72 horas de la transfección.

Transfección de cultivos de astrocitos

La transfección de los cultivos de astrocitos se realiza de la misma forma que los fibroblastos (ver sub-apartado correspondiente), pero usando medio OptiMEM sin suplementar, en vez de DMEM 4,5 g/L sin suplementar.

Plásmidos y siRNA utilizados

Todos los plásmidos utilizados para las transfecciones han sido mantenidos en bacterias competentes transformadas con dichos plásmidos, conservadas en glicerol en ultracongeladores a -80°C. Cuando era necesario su uso, se han extraído y purificado mediante kits comerciales (ver sección 4.2.). Algunos de ellos ya estaban disponibles en el laboratorio, otros han sido adquiridos o cedidos amablemente por otros investigadores, y otros han sido generados mediante clonación de ADN y mutagénesis dirigida a raíz de este estudio (ver sección 4.10.). La lista de plásmidos se detalla en la sección 17.3.

Por otro lado, los siRNA han sido adquiridos, diluidos en agua libre de nucleasas hasta la concentración especificada y conservados en congeladores a -20°C. La lista de siRNA se detalla en la sección 17.5.

4.10. Generación de las formas de mitofusinas con dominios modificados

Para la construcción de Mfn2-mt se amplificó el DNAc de la Mfn2 humana de los nucleótidos 404 a 1842 con los primers F 5'-GGG TAG AGG GCA CAG ATG CGG ATG-3' (Mfn2mtF) y R 5'-AAA **GGA TCC** TGC AAG CTT GGT CCT GGA GGC CAG-3' (Mfn2mtR), en los cuales se añadieron dianas de restricción para BamHI (negrita) y HindIII (cursiva). Después, se cortó el plásmido y el producto de la PCR con *Stu*I y BamHI, y se substituyeron los nucleótidos desde el 430 hasta el extremo 3' del plásmido de Mfn2 con el producto de la PCR mediante una ligación. Finalmente, se cortó la construcción con BamHI y HindIII y se ligó un oligonucleótido con extremos cohesivos para BamHI y HindIII que codificaba para la señal de localización mitocondrial ActA (TLILAMLAIGVFSLGAFIKIIQLRKNN, aminoácidos 613-639).

Para la forma que únicamente contiene el dominio HR1 (AA 376-423), se amplificó el DNAc de la Mfn2 humana con los primers F 5'-AAA **GGA TCC** AAG CAG ATT GC GCG GTT CG-3' (CC1F) y R 5'-AAA GAA *TTC* CAT CGT AAT CTG CTT AAT TCG CAG C-3' (CC1R), en los cuales se añadieron dianas de restricción para BamHI (negrita) y EcoRI (cursiva). El producto de la PCR fue clonado en un vector pEF1-V5/His (Invitrogen) en los lugares de corte de BamHI y EcoRI. Para la versión corta de HR1 (AA 393-416) se siguió la misma estrategia, pero utilizando los primers F 5'-AAA **GGA TCC** ATG CGT GAA GAG CGG CAA GAC-3' (CCcF) y R 5'-TT TTT GAA *TTC* TAC TTA TAG TCT TGA GCC AAG AG-3' (CCcR).

Para generar la forma Mfn2- Δ HR1, se amplificó todo el plásmido de la Mfn2 humana excepto el dominio HR1 (AA 366-422) con los plásmidos F 5'-AAA **AAG CTT** ACG GAG GAA GTG GAG AGG CAG G-3' (MdCCF) y R 5'-AAA **AAG CTT** GGC CCG GAC CGT GTG CTG C-3' (MdCCR), los cuales contienen dianas de restricción para HindIII (negrita). Posteriormente, el plásmido se religa en los lugares de corte de HindIII. Esta forma fue utilizada para la construcción de la forma Mfn2-HR1(1), introduciendo el dominio HR1 de Mfn1 (AA 346-401) en Mfn2- Δ HR1 (AA 366-422). Para ello, se amplificó el dominio HR1 de Mfn1 de ratón con F 5'-AAA **AAG CTT** CAG ATA CTA GAC ACT GTG AA-3' (mM1CCF) y R 5'-AAA **AAG CTT** GAC CTC CTT GAT CTT CTT AAC-3' (mM1CCR), los

cuales contienen dianas de restricción para HindIII (negrita). Después, se digirió el producto de la PCR y se clonó en Mfn2- Δ HR1.

Para la construcción de la forma Mfn1-RE se amplificó la Mfn1 de ratón con los primers F 5'-AG CAA **GAA TTC** ATG GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG GTG GCA GAA ACG GTA TCT CCA CTG AAG C-3' (Myc-Mfn1) y R 5'- T TTT *CAC GTG* AGG GAC GCC AAT CCT GTG-3' (mMfn1-PmlI), en los cuales se añadieron dianas de restricción para EcoRI (negrita) y PmlI (cursiva), y así generar una construcción Myc-Mfn1. El producto de la PCR se clonó en el vector pGEM-T (Promega). Por otro lado, se introdujo una mutación en el plásmido Mfn2-RE para insertar una diana de restricción de PmlI (cursiva), utilizando los plásmidos F 5'-GC CTC CTT *CAC GTG* CAG GAC CTC CAT G-3' (hTM2F) y R 5'-CAG GCC GGT AAC CAT GGA AAC-3' (hTM2R). Después, se cortó con PmlI y EcoRI el vector pGEMT con el inserto Myc-Mfn1 y Mfn2-RE con la mutación para ser cortada con PmlI. Finalmente, se ligó la digestión en los lugares de corte y se revirtió la mutación generada. Así pues, esta forma contiene los aminoácidos del 1 al 592 de Mfn1 y del 612 a 647 de Mfn2+YFFFT (señal de localización a RE).

Para generar las formas Mfn1-TM2 y Mfn2-TM1 se insertaron dianas de restricción para PmlI (negrita) delante del dominio TM de Mfn1 de ratón (AA 592) con los primers F 5'-TC CCT **CAC GTG** GAG AAC CTC CAT G-3' (TMmut1F) y R 5'-CGC CAA TCC TGT GAT CAG GGT G-3' (TMmut1R), y de Mfn2 de ratón (AA 611) con los primers 5'-GC CTC TCT **CAC GTG** TAG GAC CTC CAT G-3' (TMmut2F) y R 5'-CAG GCC AGT AAC CAT GGA GAC-3' (TMmut2R). Las zonas N-terminal (hasta antes del dominio TM) se obtuvieron cortando con NheI y PmlI, entonces se clonó la de Mfn2 en la C-terminal de Mfn1 y viceversa. La clonación de Mfn1-TM2 produjo un cambio de una Ser por una Cys, por lo que se revirtió la mutación con los primers F 5'-CGT CCC TCA **CGA** GCA GGA CCT CCA TG-3' (RevMfn1ERF) y R 5'-CCA ATC CTG TGA TCA GGG TGA TC-3' (RevMfn1ERR).

Para obtener la forma Mfn1-Ras2, se generaron dianas de restricción para PmlI (negrita) en el N-terminal de Mfn1 de ratón (AA 75) con los primers F 5'-CT CGG AGA **CAC GTG** AAG GTG GCA TTT TTT G-3' (Rasmus1F) y R 5'-ACA GCA CCT CCC CAA TGA CAG C-3' (Rasmus1R) y en el RBD de Mfn2 de ratón (AA 96) con los primers F 5'- TT TTT GGC CGG ACG AGC AAT GGG AAG-3' (Rasmus2F) y R 5'-A AGC CAC CTT **CAC GTG** CCG

CCT G-3' (Rasmut2R). El RBD de Mfn2 se obtiene cortando con NheI y PmlI y se clona en la Mfn1 de ratón, a la cual se ha eliminado el N-terminal cortando con NheI y PmlI. Finalmente, para construir la Mfn1-TM2Ras2, a partir de Mfn1-TM2 se clona el RBD de Mfn2 de ratón, del mismo modo que el de Mfn1-Ras2, cortando con NheI y PmlI.

5. Cuantificación de proteína

Durante este trabajo, se han realizado distintas técnicas, como por ejemplo la medida de consumo de oxígeno o de proximidad ER-mitocondrias mediante luminiscencia, en las cuales es necesario normalizar los resultados obtenidos según la cantidad de células presente en el pocillo. Esto se debe a que el valor obtenido tras realizar la medida, no proviene de una célula específica, como pasa en otras técnicas aquí empleadas, sino de un número de células indeterminado. Por ello, se utiliza la cuantificación de proteína como medida indirecta de la cantidad de células. No obstante, cuantificar proteínas tiene una gran utilidad en muchas más aplicaciones, como por ejemplo al cargar la misma cantidad de muestra para realizar un *western blot* tras extraer proteína.

La cuantificación de proteínas se ha llevado a cabo mediante el kit *PierceTM BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific), utilizando placas de 96 pocillos y de la siguiente forma:

1. Se prepara en distintos tubos la recta patrón de albúmina de suero bovino, partiendo del stock 2 mg/ml y diluyéndolo 1:2 en agua milliQ hasta 0,0625 mg/ml. Además, se añade otro tubo solo con agua milliQ que por tanto será 0 mg/ml. Los tubos de la recta patrón no hace falta prepararlos cada vez, se preparan la primera vez y se pueden conservar a temperatura ambiente.
2. Se añaden 5 µl de cada concentración de la recta patrón por pocillo (por triplicado).
3. Se añaden 5 µl de lisado de la muestra por pocillo (por triplicado).
4. Se prepara la solución de reacción, añadiendo 150 µl de reactivo A por pocillo a hacer la reacción (siempre preparando un poco en exceso) en un tubo.

5. Si se ha añadido un volumen X de reactivo A, se añade en el mismo tubo un volumen X/50 de reactivo B.
6. Se mezcla bien la solución y se vierte en un *reservoir*.
7. Con una pipeta multicanal, se añade 150 µl de solución por pocillo.
8. Se incuba entre 30-45 minutos en una estufa a 37°C.
9. Se mide la absorbancia a A562 utilizando un lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN).
10. Se realizan los cálculos pertinentes a partir de los valores de absorbancia obtenidos en la recta patrón, dado que sus concentraciones son conocidas, para saber la concentración proteica de las distintas muestras.

6. Western blot

El *Western blot* es una técnica analítica muy comúnmente utilizada en biología celular y molecular para separar proteínas que se encuentran en extractos celulares o tejidos e identificarlas específicamente utilizando anticuerpos.

6.1. Preparación de la muestra

Primeramente, se debe preparar la muestra proteica para realizar el procedimiento de separación e identificación de la proteína de interés. En este trabajo, se ha trabajado con extractos celulares procedentes de los cultivos celulares sembrados en placas de 24 pocillos.

Para obtener dichos extractos se ha utilizado tampón Laemmli 1.5x, que contiene Tris 1,5 M pH6,8, glicerol 15%, SDS 3%, β-mercaptoetanol 7,5% y azul de bromofenol 0,0375%. Este tampón facilita la lisis celular para la obtención del contenido proteico y la consiguiente carga para realizar la electroforesis. Para llevar a cabo el procedimiento se siguen los siguientes pasos:

1. En una campana de extracción de gases, se aspira el contenido de los pocillos donde se encuentran las células.
2. Inmediatamente se añade 35 µl de tampón Laemmli 1.5x por pocillo.

3. Con una punta azul de pipeta (P1000), se rasca la superficie del pocillo para favorecer la lisis de las células y la salida de su contenido, en el cual se encontrarán las proteínas.
4. Se recogen los extractos celulares con la pipeta y se pasan a un eppendorf.
5. Se centrifuga durante 10 segundos.
6. Se calienta el tubo a 100°C durante 5-10 minutos.
7. Se centrifuga de nuevo durante 10 segundos.

A partir de este momento, las muestras están listas para ser cargadas en un gel de poliacrilamida y realizar la electroforesis SDS-PAGE (ver sección 6.2.). De lo contrario, las muestras se pueden conservar a -20°C hasta su utilización, aunque se deberá repetir los pasos 6 y 7 cuando vayan a usarse.

6.2. Electroforesis SDS-PAGE

Durante este procedimiento las proteínas extraídas son desnaturalizadas con detergente SDS, el cual también confiere carga negativa a las proteínas. De este modo, es posible separar las proteínas únicamente en función de su peso molecular a lo largo de un gel de poliacrilamida mediante electroforesis, aplicando una diferencia de potencial que hace migrar las proteínas hacia el polo positivo.

Igual que con el gel de agarosa, el tamaño del poro del gel de poliacrilamida (según el porcentaje de poliacrilamida que componga el gel) también determina la capacidad de migración de las proteínas. Cuanto mayor sea su porcentaje mejor resolverá la separación de proteínas de bajo peso molecular, y viceversa. Para la realización de la electroforesis se utiliza un gel con dos concentraciones diferentes:

- Gel de empaquetamiento: Conformar la parte superior del gel, donde están los pocillos para cargar la muestra proteica. Tiene un porcentaje bajo de poliacrilamida y su objetivo es que las proteínas queden alineadas antes de su separación.
- Gel de separación: Conformar el resto del gel, donde se va a llevar a cabo la separación. Su porcentaje en poliacrilamida depende del grado de resolución

deseado, y oscila entre 7,5-12%. Para este trabajo se han utilizado de manera general geles de separación al 9% de poliacrilamida.

Para realizar la electroforesis SDS-PAGE, se ha utilizado el sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (Bio-Rad) y se han seguido los siguientes pasos:

1. Se montan los cristales en los soportes del sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell* y se prepara en un tubo el gel de separación de poliacrilamida utilizando los volúmenes de la siguiente tabla (para un gel al 9% de poliacrilamida):

Componente	Cantidad
Agua MilliQ	4,3ml
Tris 1,5M pH8,8	2,5ml
SDS 10%	100µl
Acilamida 30%	3ml
APS	90µl
TEMED	7µl

2. Una vez preparado, se agita y se vierte entre los dos cristales, dejando libre la parte superior, la cual se rellena con agua MilliQ de manera cuidadosa. Se deja polimerizar el gel.
3. Se prepara el gel de empaquetamiento, según los siguientes volúmenes:

Componente	Cantidad
Agua MilliQ	3,05ml
Tris 0,5M pH6,8	1,25ml
SDS 10%	50µl
Acilamida 30%	0,65ml
APS	60µl
TEMED	7µl

4. Se agita, se retira el agua de la parte superior de los cristales por decantación y se vierte en la parte superior de los cristales, colocando el peine que actúa como molde de los pocillos. Se deja polimerizar el gel.
5. Se prepara el tampón de electroforesis 1X a partir del stock 10X, diluyéndolo en agua MilliQ.
6. Se monta el sistema de electroforesis con el gel y el tampón de electroforesis.
7. Se cargan los pocillos con la muestra proteica (15-40 µl), dejando los dos pocillos de los extremos para cargar el marcador de pesos molecular *Spectra*

BR (Thermo Fisher Scientific), cargando en uno de ellos 7 μl y el otro 3 μl (y así distinguir cual es cada extremo).

8. Se conectan los electrodos al sistema y se aplica una diferencia de potencial de 110 V. Se dejan migrar las muestras a través del gel hasta que el frente de avance, marcado por el azul de bromofenol, llegue hasta la parte inferior del gel (75-90 minutos).
9. Se desmonta el sistema de electroforesis y se extrae el gel, con el cual se realizará la transferencia (ver sección 6.3.).

6.3. Transferencia de proteínas a la membrana

Una vez las proteínas han migrado por el gel de poliacrilamida y se han separado, es necesario transferirlas a una membrana, en este caso de PVDF, para que puedan ser detectadas posteriormente por anticuerpos. Este procedimiento se realiza mediante electrotransferencia, aplicando una corriente eléctrica que promueve la migración de las proteínas del gel a la membrana, las cuales se encuentran contiguas.

Para realizar la transferencia se ha utilizado el sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) y las membranas de PVDF *Immobilon-P* (Merck), siguiendo los siguientes pasos:

1. Se prepara el tampón de transferencia 1X, mezclando 700 ml agua MilliQ, 200 ml metanol y 100 ml tampón de transferencia 10X.
2. Se recorta una membrana de PVDF y dos trozos de papel *Whatman* de una medida un poco mayor a la del gel (6x8,5 cm).
3. Se incuba la membrana de PVDF en una cubeta pequeña con metanol durante 30-60 segundos (para activarla).
4. Mientras tanto, se extrae el gel de los cristales con cuidado de no romperlo con la ayuda de una espátula y un papel *Whatman* (el papel se pega al gel y ayuda a su extracción del cristal). Se descarta la parte del gel de empaquetamiento.
5. Se sumerge la membrana de PVDF en otra cubeta pequeña con tampón de transferencia, hasta que queda totalmente impregnada y deja de flotar.
6. En una cubeta grande con tampón de transferencia se prepara el “sándwich” de transferencia. Para ello, primero se coloca la parte negra del *cassette*, que

formará la parte externa del “sándwich” para que actúe como base (tiene una parte negra y otra transparente). Encima se coloca una esponja rectangular del propio sistema. Encima se coloca el papel de *Whatman* con el que hemos extraído el gel, con el gel mirando hacia arriba. Después se coloca la membrana activada, otro papel *Whatman*, otra esponja y por último se cierra el sándwich colocando la parte transparente de la pieza que conforma la parte externa, que actúa como un *cassette*. Es muy importante que no haya burbujas entre el gel y la membrana (para ello una vez montado el segundo papel de *Whatman* se puede pasar un rodillo por encima) y que el orden del sándwich sea siempre el descrito.

7. Se introduce el *cassette* en la cubeta de transferencia, siempre colocando la parte negra del *cassette* con la parte negra de la cubeta, para que las proteínas migren en dirección a la membrana y no al contrario.
8. Se coloca un bloque de hielo dentro de la cubeta de transferencia, al lado del *cassette* (para evitar el excesivo calentamiento del sistema durante el proceso), y se añade tampón de transferencia hasta llenar la cubeta.
9. Se aplica un potencial de 75 V durante 90 minutos. Tras este periodo de tiempo, se puede estimar la eficiencia de la transferencia a partir de la nitidez de las bandas del marcador de peso molecular.

6.4. Bloqueo de la membrana

Dado que en el posterior paso de detección mediante anticuerpos y éstos pueden unirse a la membrana de manera inespecífica, es necesario bloquear los lugares que han quedado libres de proteína tras la transferencia. Tras preparar la solución de bloqueo, las proteínas en solución se unirán a aquellos lugares que no estén ocupados ya por las proteínas transferidas desde el gel, evitando de este modo uniones inespecíficas de los anticuerpos. Para ello, se utiliza leche desnatada en polvo, de la manera que se detalla a continuación:

1. Se prepara la solución de bloqueo, la cual consta de PBS1X y leche desnatada en polvo al 5% (5 g/100 ml).

2. Se vierten 10 ml de solución de bloqueo en una cubeta pequeña y se coloca en ella la membrana.
3. Se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora, en agitación.

6.5. Inmunodetección

El último paso del *Western blot* consta de la detección de la proteína de interés. En este trabajo se realiza mediante un anticuerpo primario específico contra dicha proteína y un anticuerpo secundario contra el primario, y conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP). Esta peroxidasa cataliza la oxidación del luminol, generando una pequeña cantidad de luz que puede ser detectada con films fotográficos. Como sustrato de la HRP se ha utilizado el *ClarityTM Western ECL Substrate* (Bio-Rad) y como film fotográfico el *Carestream[®] Kodak[®] Biomax[®] light film* (Sigma-Aldrich).

Para realizar la inmunodetección se ha seguido el siguiente proceso:

1. Tras el bloqueo, se introduce la membrana en una bolsita de plástico, se añaden 2 ml del anticuerpo primario preparado en solución de bloqueo a la concentración que corresponda (ver sección 17.1.) y se sella la bolsita.
2. La bolsita se incuba toda la noche a 4°C en agitación orbital.
3. Al día siguiente se abre la bolsita y se recupera el anticuerpo primario, conservándolo a -20°C hasta su siguiente uso (se reutiliza hasta que se empieza a notar que su actividad no es tan eficaz).
4. Se pone la membrana en una cubeta pequeña con PBS 1X + Tween 0,05%, donde se realizan 3 lavados de 5 minutos en agitación a temperatura ambiente.
5. Tras los lavados, se pone en la cubeta pequeña 10ml de solución de bloqueo con 3,5 µl del anticuerpo secundario correspondiente (ver sección 17.2.). Se incuba 1 hora en agitación.
6. Se descarta la solución de bloqueo con anticuerpo secundario y se realizan 3 nuevos lavados de 5 minutos con PSBx 1X + Tween 0,05%.
7. Mientras se realizan los lavados se prepara un *cassette* de revelado, pegando una bolsita de plástico en el interior.
8. En otra cubeta pequeña se pone 1 ml de reactivo A y 1 ml de reactivo B de *ClarityTM Western ECL Substrate*.

9. Se lleva hacia la cámara oscura la cubeta con ECL, la cubeta con la membrana, el *cassette* y los films fotográficos.
10. Allí y ya en oscuridad (hasta finalizar el proceso), se traspasa la membrana a la cubeta del ECL y se agita manualmente durante 1 minuto y medio, impregnando totalmente la membrana con el ECL.
11. Se coloca la membrana dentro de la bolsita que hay en el interior del *cassette* de revelado, y por encima se ponen varios trozos de film fotográfico (recortados en ese momento). Se cierra el *cassette* y se mantiene en oscuridad durante varios minutos (según la eficacia del anticuerpo utilizado).
12. Mientras tanto, se llenan las tres cubetas necesarias posteriormente con solución reveladora, agua destilada y solución fijadora.
13. Pasado el tiempo estipulado, se abre el *cassette* y se sacan los trozos de films. Se ponen en solución reveladora y se agita manualmente la cubeta para impregnar totalmente los films. Pasado unos instantes (varía según la calidad de los anticuerpos o número de usos del revelador) se empiezan a ver las bandas correspondientes a la luz generada por la HRP. A mayor intensidad de banda, mayor cantidad de proteína (a la cual se han unido los anticuerpos).
14. Se pasa los films a la cubeta con agua para limpiar los restos de solución reveladora, y finalmente se pasan a la solución fijadora. Se agita durante unos instantes hasta que el color de los films se vuelve más transparente.
15. Se vuelven a lavar los films con agua, se guardan las soluciones reveladora y fijadora en el armario (protegido de la luz) y ya se puede encender la luz de nuevo.

6.6. Borrado de la membrana

Una vez finalizado el procedimiento, es posible que se quiera identificar una segunda o tercera proteína de interés, o incluso más. Para ello, en vez de empezar de nuevo, se puede proceder a “borrar” la membrana, proceso también llamado *stripping*. Este proceso consiste en eliminar tanto el bloqueo como la inmunodetección, como si se reiniciara el proceso de nuevo después de la transferencia. Aunque este proceso es muy útil, ya que permite realizar comparación directa entre distintas proteínas (ya que provienen de la misma membrana), hay que tener en cuenta que si se realiza repetidas

veces, las bandas de proteínas transferidas también pueden verse afectadas, ya que es un proceso agresivo. Por eso, se recomienda utilizarlo si hay que comparar distintas proteína en una misma membrana, pero sin excederse.

En este trabajo se ha utilizado la solución de borrado *ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution 10X* (Merck) y se han llegado a realizar hasta tres *strippings* de una misma membrana, siguiendo el siguiente proceso:

1. Se prepara la solución de borrado, diluyendo en agua MilliQ el stock 10X hasta concentración 1X. Esta solución se puede reutilizar varias veces, hasta que se perciba que empieza a perder eficacia.
2. Se pone la membrana en una cubeta pequeña con 10 ml de solución de borrado y se incuba en agitación y temperatura ambiente durante 20 minutos.
3. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10 ml solución de bloqueo.
4. Se realiza una incubación de 1 hora a temperatura ambiente y agitación con 10 ml solución bloqueo.
5. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PSB 1X + Tween 0,05%.

A partir de este punto, ya se puede realizar una nueva inmunodetección, siguiendo desde el paso 1 de la sección 6.5.

6.7. Densitometría

Una vez obtenidas las bandas que determinan la cantidad de proteína presente en la muestra, es posible medir la intensidad de las mismas y transformarlo en un valor numérico, haciendo del *western blot* una técnica semicuantitativa. Para analizar un film por densitometría se siguen los siguientes pasos:

1. Se escanea el film, guardándolo en formato TIFF.
2. Se abre la imagen con el programa de procesamiento de imagen digital "ImageJ".
3. Se transforma la imagen a escala de grises 8-bit: Image>Type>8-bit.
4. Se invierte la escala de grises: Edit>Invert.

5. Se hace un rectángulo en el cual quepa cada una de las bandas individualmente, lo que será el área de interés o "ROI". Se va moviendo el rectángulo para ir englobando cada una de las bandas, sin cambiar las dimensiones del rectángulo. Cada vez que se englobe una banda se mide la intensidad Analyse>Measure (también se puede apretar la tecla "m" directamente) y nos da un valor por cada medida realizada.
6. Con el mismo rectángulo, se coloca sobre el fondo de la imagen y se mide la intensidad. De este modo, obtenemos un valor "blanco" o *background*, el cual se restará a los valores obtenidos en cada una de las medidas de las bandas.
7. Los valores obtenidos se normalizan por el valor del control de carga de cada muestra, el cual es generalmente actina, y se relativizan con respecto a la condición control.

7. Análisis de expresión génica

Los análisis de expresión génica se han llevado a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR), una variante de la PCR que permite cuantificar el producto de una amplificación de ADN de doble cadena. Del mismo modo que la PCR, es necesario un ADN que actúe como molde, un par de cebadores, ADN polimerasa y dNTPs, pero en este caso también es necesaria la presencia de una sonda fluorescente. Esta sonda, es capaz de unirse al ADN de doble cadena, por lo que a medida que se va amplificando la secuencia de ADN de interés, la sonda va uniéndose a las nuevas moléculas sintetizadas por la ADN polimerasa. Tras cada ciclo de amplificación, el termociclador realiza una medición de fluorescencia gracias a los sensores que lleva acoplados, pudiendo de este modo cuantificar en tiempo real la cantidad de muestra. El ADN molde utilizado para el análisis de expresión génica es ADN complementario (ADNc), obtenido por retro-transcripción del ARN. Por lo tanto, si un gen se está sobreexpresando, habrá más ARN de dicho gen, se generará más ADNc al realizar la retrotranscripción y se captará más fluorescencia durante la qPCR si se utilizan cebadores para amplificarlo.

7.1. Aislamiento de ARN

Primero, hay que llevar a cabo el aislamiento de ARN para posteriormente generar ADNc que servirá de molde para la qPCR. Para ello se ha utilizado el kit *PureLinkTM RNA Mini Kit* (Invitrogen), basado en columnas con membrana de sílice. El ARN ha sido extraído de 500.000 células transfectadas y separadas por citometría de flujo (ver sección 10.). El proceso es el siguiente:

1. Las células separadas por citometría de flujo se recuperan en un tubo con RNAlater.
2. Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante.
3. En una campana de extracción de gases, se añade a cada tubo 350 μ l del tampón de lisis del kit con un 1% en β -mercaptoetanol.
4. Se pipetea varias veces para homogeneizar las células y que el tampón de lisis actúe correctamente en todas ellas.
5. Se transfiere el lisado de los diferentes tubos a un eppendorf.
6. Se sigue el protocolo del kit para aislar el ARN del lisado.
7. Tras aislar el ARN, se mide su concentración con el lector *Infinite200PRO* (TECAN), del mismo modo que se ha detallado con el ADN (ver sección 4.3.).

7.2. Síntesis de ADNc

Una vez obtenido el ARN, se debe realizar la retro-transcripción para obtener ADNc. Para ello, en este trabajo se ha utilizado el kit *SuperscriptTM III First-Strand Synthesis Super Mix* (Invitrogen), de la siguiente forma:

1. Para cada muestra, en un tubo de PCR se realiza la siguiente mezcla:

Componente	Cantidad
RNA	1000ng
2X RT Reaction Mix	10 μ l
RT Enzyme Mix	1,5 μ l
Agua libre de RNAsas	Hasta 20 μ l

2. Se introducen los tubos en el termociclador y se lleva a cabo el siguiente programa:

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

7.3. Reacción de qPCR

El último paso para analizar la expresión de un gen, consiste en realizar la reacción de qPCR a partir del ADNc sintetizado previamente. Para ello, se ha realizado con la ayuda de *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega) y el termociclador *StepOnePlus™ System* (Applied Biosystems). Los primers empleados se han diseñado mediante el programa *Primer-BLAST* del NCBI y se detallan en la sección 17.4. Además, como control interno se mide el nivel de expresión del ARN ribosomal 18S, el cual dado su elevado nivel de expresión basal, para su análisis las muestras de ADNc se diluyen previamente 1:200. El protocolo utilizado es el siguiente:

1. Se prepara la mezcla para la reacción de todos los genes a analizar por triplicado en un mismo tubo y después se reparten en tres tubos especiales de qPCR por gen a razón de 14 µl por tubo. Para una reacción, las cantidades necesarias son las siguientes (para calcular la cantidad total necesaria se multiplican las cantidades de la tabla por el número de genes a analizar y por el triplicado de cada uno):

Componente	Cantidad
<i>Forward primer</i> 10 µM	0,45µl
<i>Reverse primer</i> 10 µM	0,45µl
<i>GoTaq® qPCR MM 2X</i>	7,5µl
Agua libre de RNAsas	5,6µl

2. Se añade 1 µl de cDNA a su tubo correspondiente (3 tubos en total, ya que cada muestra se realiza por triplicado).
3. Se mezcla el contenido de los tubos y se realiza un centrifugado rápido para evitar que el líquido se disperse por el tubo.

4. Se introducen los tubos en el termociclador *StepOnePlus™ System* (Applied Biosystems) y se ejecuta el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo
95°C	10 min
95°C	30 seg
60°C	40 seg
72°C	30 seg
95°C	15 seg
60°C	1 min
95°C	15 seg

x 40

5. Mediante el programa *StepOnePlus™ software V2.1* (Applied Biosystems), para cada gen analizado se obtiene un valor de umbral de ciclo (Ct) a partir de su curva de amplificación. Este valor corresponde al ciclo de amplificación a partir del cual el producto amplificado emite un nivel de fluorescencia detectable.
6. A partir del valor Ct de cada gen analizado, se calcula su expresión relativa en una determinada condición (ΔCt), el cual es la diferencia entre el valor Ct del gen de estudio (Ct_{gen}) y el del control interno (Ct_{18S}), tal como se detalla a continuación:

$$\Delta Ct = Ct_{gen} - Ct_{18S}$$

7. Con el valor ΔCt se puede calcular el valor $\Delta\Delta Ct$, el cual es la diferencia entre la expresión relativa del gen analizado en una determinada condición (ΔCt_{cond}) y la muestra control (ΔCt_{ctrl}), tal como se detalla a continuación (en el caso de la muestra control $\Delta\Delta Ct=0$):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{cond} - \Delta Ct_{ctrl}$$

8. Finalmente, a partir del valor $\Delta\Delta Ct$ se puede calcular la ratio de expresión del gen en cuestión bajo una determinada condición respecto a su muestra control. Dado que cada ciclo de diferencia entre dos condiciones corresponde a una diferencia de ADN del doble de cantidad, se calcula de la siguiente manera:

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

8. Análisis de la actividad transcripcional

El análisis de la actividad transcripcional se ha realizado mediante el uso combinado de las luciferasas *firefly* y *Renilla*. La primera de ellas cataliza la reacción de oxidación de luciferina a oxiluciferina, emitiendo luminiscencia durante el proceso. La segunda, cataliza la reacción de oxidación de coelenterazina a coelenteramida, emitiendo también luminiscencia durante el proceso.

Para ello se han utilizado plásmidos con unas construcciones compuestas, por un lado, por el gen de la luciferasa *firefly* bajo control del promotor del gen de interés y, por otro lado, por el gen de la luciferasa *Renilla* bajo control del promotor de CMV. Estos plásmidos han sido co-transfectados 48 horas antes de llevar a cabo el experimento. Para la detección de la actividad luciferasa se ha utilizado el kit comercial *Dual-Glo[®] Luciferase Assay System* (Promega), siguiendo el protocolo establecido en el mismo. De este modo, aplicando los substratos de ambas reacciones de oxidación de manera secuencial, se puede determinar la luminiscencia producida mediante un luminómetro, en este caso el lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN).

Como control de la transfección se ha utilizado la construcción de la luciferasa *Renilla* bajo el promotor de CMV, la cual permite normalizar la luminiscencia de la luciferasa *firefly* en función de la eficiencia de transfección.

9. Técnicas histológicas

Las técnicas histológicas son un conjunto de manipulaciones a las que se somete un tejido biológico con el objetivo de estudiar posteriormente su composición, estructura y características mediante microscopía. En este estudio, se han llevado a cabo técnicas histológicas como son la realización de cortes histológicos a partir de cerebros murinos o la tinción de los mismos mediante la impregnación argéntica de Golgi (o tinción de Golgi), con el objetivo de estudiar la morfología neuronal durante su desarrollo, en condiciones normales y suprimiendo la expresión de proteína Mfn2.

9.1. Tinción de Golgi

La impregnación argéntica de Golgi (o tinción de Golgi), se fundamenta en la formación de depósitos intracelulares de cromato argéntico, los cuales son opacos, al producirse una reacción entre bicromato de potasio y nitrato de plata. Esta técnica permite observar tanto el soma como las dendritas y axones de las neuronas, y además, sólo se tiñe un pequeño porcentaje de neuronas, por lo que se permite estudiarlas de manera individual. Por lo tanto, es una técnica ideal para el estudio de la morfología neuronal, la ramificación de sus árboles dendríticos, y la disposición y características de sus espinas dendríticas.

Para realizar la tinción de Golgi se ha utilizado el kit *FD Rapid GolgiStain* (FD NeuroTechnologies), de la siguiente manera:

1. Se prepara la mezcla de soluciones A y B a partes iguales 24 horas antes de sacrificar los animales. Se deja reposar en oscuridad para que los precipitados generen un poso, hasta su uso.
2. En tubos de 10 ml con fondo redondo, se añaden 2,5 ml de la mezcla A+B.
3. Se sacrifican los animales por decapitación e inmediatamente se extrae el cerebro.
4. Se limpia los restos de sangre y meninges, y se deposita en el tubo con mezcla A+B.
5. Al día siguiente se elimina el líquido y se ponen 2,5 ml nuevos de mezcla A+B.
6. Se mantienen los cerebros sumergidos en el líquido durante 2 semanas, protegidos de la luz y agitando los tubos cada tres días.
7. Se elimina el líquido y se añade 2,5 ml de solución C.
8. Al día siguiente se elimina el líquido y se añade de nuevo solución C.
9. Se mantienen los cerebros sumergidos en el líquido entre 3 y 7 días, protegidos de la luz.
10. Se elimina la solución C y se secan los cerebros con papel absorbente.
11. Los cerebros se congelan en hielo seco a -80°C hasta la realización de los cortes histológicos (se pueden mantener hasta un par de semanas), para endurecer los tejidos cerebrales y facilitar los cortes.

12. Se realizan los cortes histológicos (ver sección 9.2.).
13. Se llevan los portaobjetos a una campana de extracción de gases y se marcan los bordes con una solución hidrofóbica con la ayuda del *SuperPAP Pen* (Invitrogen).
14. Con la ayuda de una pipeta pasteur (igual que en los siguientes pasos), sobre los cortes se realizan 2 lavados de 4 minutos con agua MilliQ.
15. Se incuban los cortes durante 10 minutos en una mezcla que consta de solución D, solución E y agua MilliQ (1:1:2).
16. Se realizan 2 lavados de 4 minutos con agua MilliQ.
17. Se realizan incubaciones de 4 minutos cada una con las siguientes soluciones (en este orden): etanol 50%, etanol 75%, etanol 95%, etanol 100% (x2), con el objetivo de deshidratar los cortes.
18. Se realizan 2 lavados de 4 minutos con Xileno.
19. Se deposita una gota de medio de montaje *Eukitt* (Sigma) sobre cada sección de tejido del portaobjetos, y se coloca encima un cubreobjetos de vidrio.
20. Los portaobjetos se conservan a temperatura ambiente protegidos de la luz hasta su observación con el microscopio.

9.2. Realización de cortes histológicos

Para realizar un estudio histológico, es necesario obtener muestras del tejido a estudiar para proceder a su observación. En este caso, como el objetivo es estudiar la morfología neuronal se requiere la obtención de secciones de cerebros murinos adheridos sobre portaobjetos. Los cortes histológicos se han obtenido mediante criosección, con la ayuda de un criostato, en cerebros previamente congelados para endurecer los tejidos cerebrales. Para ello, se sigue el siguiente procedimiento:

1. Se cogen unas pinzas, un pincel fino, un tubo con agua destilada, uno con solución C (del kit de tinción de Golgi, ver sección 9.1.) y otro con acetona, y se lleva a la sala del criostato.
2. Se lava bien la cuchilla con acetona, se seca y se monta en el criostato.

3. Antes de empezar el procedimiento, se ajusta la temperatura de la cámara del criostato a -24°C y la temperatura de la muestra a -23°C (es importante que la cámara se mantenga por debajo de la temperatura de la muestra).
4. Se recogen los cerebros almacenados en el ultracongelador a -80°C , y se depositan en una caja con hielo seco. En el hielo seco también se coloca el tubo con agua destilada.
5. Dentro de la caja de hielo seco, se monta el cerebro sobre la superficie del portamuestras del criostato con la ayuda de agua destilada, aprovechando que ya está fría y al entrar en contacto con el portamuestras se va a congelar, momento en el cual se depositará el cerebro encima para fijarlo sobre el portamuestras.
6. Se sumerge el pincel fino en el agua destilada, impregnando con cuidado la superficie del cerebro fijado en el portamuestras, para que quede todo envuelto del líquido congelado.
7. Se coloca el portamuestras con el cerebro fijado dentro de la cámara del criostato y se espera un poco, para que alcance la temperatura adecuada.
8. Se ajusta el grosor de corte a $150\ \mu\text{m}$ y se procede a cortar el cerebro en secciones.
9. Las secciones obtenidas se van recogiendo con la ayuda de una pipeta pasteur de vidrio con la punta en forma de gancho y se dejan sobre gotas individuales de solución C, previamente depositadas encima de portaobjetos *Superfrost PlusTM*, los cuales presentan un recubrimiento que facilita la adhesión de la muestra.
10. Los portaobjetos se protegen de la luz y se guardan a temperatura ambiente durante 1-3 días, para que las gotas de solución C se sequen.

10. Separación celular por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica biofísica basada en la utilización de un láser que incide sobre un flujo continuo de células en suspensión que pasan por un tubo transparente finísimo, haciendo que las células vayan pasando de una en una a través de un dispositivo de detección. Este dispositivo permite un análisis multiparamétrico

simultáneo que permite separar la suspensión celular en distintos grupos de células según sus características. Hay gran cantidad de características físicas, químicas o biológicas que pueden ser detectadas con este sistema, así como técnicas de marcaje celular que se pueden llevar a cabo y campos de la biología y medicina en los cuales se aplica esta tecnología.

Para este estudio en concreto, esta técnica se ha utilizado para determinar qué células han llevado a cabo con éxito la transfección celular transitoria (ver sección 4.9.). Esto es importante, dado que en una población celular sometida a una transfección y en la cual se realizará posteriormente un experimento para determinar un parámetro en concreto, hay una gran cantidad de células (la mayoría) que no han integrado el plásmido que codifica la proteína a estudiar. En consecuencia, el efecto observado al realizar el experimento en cuestión, es una subestimación del efecto real que están produciendo las células que expresan la proteína de interés que está codificada en el plásmido transfectado, ya que se ve enmascarado por las células no transfectadas. Por lo tanto, la solución a este problema es eliminar las células no transfectadas, y recuperar las transfectadas mediante citometría de flujo, para volverlas a sembrar en una placa y realizar el experimento en una población celular totalmente transfectada. Este hecho es posible, ya que junto con el plásmido que codifica para la proteína de interés, se cotransfecta con un plásmido que codifica para la proteína fluorescente verde "GFP". Por lo tanto, el parámetro que permitirá separar las células transfectadas de las no transfectadas, será la presencia de fluorescencia verde. Cabe destacar que este procedimiento solo se ha realizado con fibroblastos y astrocitos, pero no con neuronas, porque debido a su complejidad estructural y sensibilidad a los cambios, no soportan este proceso y mueren.

En fibroblastos, se siembran 150.000 células por pocillo (en una placa de 6 pocillos) y el día siguiente se co-transfectan con el plásmido de interés y con el de GFP (ver sección 4.9.), excepto un pocillo que se utiliza como control. Después, para separarlas por citometría de flujo se siguen los siguientes pasos:

1. Dos días tras la transfección, se realiza un lavado con 1 ml PBS por pocillo.
2. Se añade 0,5 ml de tripsina (ver sección 3.1.) a cada pocillo.

3. Se añade 2 ml de DMEM 4,5 g/l glucosa suplementada (ver sección 3.1.) para inactivar la tripsina.
4. Se pipeta gran cantidad de veces con una P1000 para disgregar los agregados celulares que posteriormente podrían obstruir el citómetro, y se pasa el contenido del pocillo a un tubo Falcon de 15 ml.
5. Se centrifuga durante 5 minutos a 1000 rpm.
6. Se elimina el líquido con cuidado de no eliminar el *pellet* celular.
7. Se resuspende en 350 µl SGG (sin calcio, magnesio ni rojo de fenol) y se pasa a un eppendorf. Se colocan los eppendorfs en una caja con hielo.
8. Se añade en tubos Falcon de 15 ml (tantos como condiciones haya) 3 ml de DMEM 4,5 g/l glucosa, y se colocan en la caja con hielo.
9. Se lleva la caja al servicio de Citometría de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona y se pasa la suspensión celular a tubos especiales para citometría (en esterilidad).
10. Se cargan los tubos en el citómetro de flujo y se realiza la separación de células, utilizando el pocillo de células no transfectadas como blanco para determinar el nivel basal de fluorescencia. El número de células a separar se calculará dependiendo los pocillos necesarios para realizar el experimento posterior, teniendo en cuenta que las células separadas se sembraran en placas de 96 pocillos, a razón de 30.000 células por pocillo.
11. Se recuperan las células que presentan fluorescencia verde en los tubos Falcon de 15 ml preparados en el paso 8.
12. Se vuelven a meter los tubos Falcon con las células en el hielo, y una vez se ha acabado se vuelve al laboratorio.
13. Allí se centrifugan los tubos durante 5 minutos a 1000 rpm.
14. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en DMEM 4,5 g/l glucosa. El volumen de medio dependerá de los pocillos necesarios para realizar el experimento posterior, teniendo en cuenta que cada pocillo deberá contener 150 µl de medio.
15. Se siembra 150 µl por pocillo (volumen que contiene 30.000 células).
16. Se deja incubar la placa en la incubadora a 37°C y 5% CO₂ hasta el día siguiente, cuando se va a realizar el experimento que proceda.

En astrocitos, se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Tres días después de la transfección, se dejan las placas en un agitador mecánico a 200rpm durante 3 horas, para eliminar la microglia superficial.
2. Se realizan dos lavados con PBS 1X.
3. Se añade 0,5 ml tripsina+EDTA por pocillo.
4. A partir de este punto se sigue el mismo procedimiento que en fibroblastos, desde el punto 3.

11. Proximidad mitocondria-RE mediante luminiscencia

Con el objetivo de analizar cuantitativamente la distancia entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático (RE), se ha utilizado la tecnología de la luciferasa *Renilla* (RLuc). Esta enzima cataliza la reacción por la cual la coelenterazina se oxida produciendo coelenteramida y luminiscencia. Para ello, se utilizó el kit *ViviRenTM Live Cell Substrates* (Promega), que contiene una coelenterazina tratada que la hace más estable que la normal, la cual no puede ser utilizada para ensayos *in vivo* debido a su gran inestabilidad, sobre todo a 37°C. De este modo, esta coelenterazina tratada es apta para realizar ensayos *in vivo*, los cuales permiten determinar *in situ* la cantidad de luminiscencia producida mediante un luminómetro, que en el caso de este trabajo es el lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN).

Aprovechando esta tecnología, se ha diseñado una RLuc partida (ERMITO-RLuc), la cual se basa en el auto-ensamblaje reversible de dos porciones de la misma. Una de las partes contiene en el extremo N-terminal una señal de localización a mitocondria y la otra contiene en el extremo C-terminal una señal de localización al RE. Además, contiene una secuencia espaciadora que permite el ensamblaje de ambas partes cuando mitocondrias y RE están separados por entre 12-23,5 nm, el rango de distancia óptimo para el intercambio de calcio entre ambos orgánulos. Cuando ambos orgánulos se encuentran a esta distancia, ambos trozos se ensamblan, conformando una ERMITO-RLuc funcional y por lo tanto, produciendo luminiscencia. Si la separación es mayor, ambos trozos se mantienen separados, estado en el cual no son funcionales.

Para mediar la proximidad entre ambos orgánulos mediante luminiscencia, se han seguido los siguientes pasos:

1. Se transfectan las células con los plásmidos que codifican para ERMITO-RLuc, la proteína de interés y la proteína GFP (ver sección 4.9.).
2. Se separan las células transfectadas, y que por lo tanto expresan ERMITO-RLuc, mediante citometría de flujo y se siembran en una placa de 96 pocillos (ver sección 10.).
3. En un eppendorf se añaden 100 μ l de DMEM 4,5 g/l glucosa por pocillo a analizar y 0,1 μ l del sustrato del kit por pocillo a analizar.
4. Se resuspende bien el sustrato de la reacción en el medio.
5. Se elimina el medio que hay en los pocillos a analizar y se añade 100 μ l por pocillo de la mezcla del medio con el sustrato de la reacción.
6. Se guarda la placa en la incubadora durante 5 minutos.
7. Se mide la luminiscencia en el luminómetro.
8. Después de la lectura se elimina el medio y se añade 50 μ l por pocillo de tampón de lisis *CellLytic M* para cuantificar la proteína (ver sección 5.) de cada pocillo y normalizar el valor de luminiscencia obtenido según la masa celular de cada pocillo.

12. Tasa de consumo de oxígeno

La tasa de consumo de oxígeno (OCR, por sus siglas en inglés) es una medida usada típicamente para determinar la respiración celular, y por lo tanto, permite evaluar el estado de funcionalidad mitocondrial. En este trabajo se han utilizado dos tecnologías distintas para evaluar con mayor solidez los resultados obtenidos.

12.1. Medición mediante Seahorse XF Cell Mito Stress Test

El sistema *Seahorse XF* (Agilent) se basa en un equipo altamente especializado que realiza lecturas continuas, de manera automatizada y a tiempo real, las cuales permiten detectar cambios en la tasa de consumo de oxígeno tras la aplicación de distintos moduladores de la respiración mitocondrial en células *in vivo*. Estos moduladores, como son la rotenona, antimicina A y oligomicina, inhiben distintos

complejos de la cadena de transporte de electrones, mientras que el CCCP desacopla el gradiente de protones (Fig.19A). De este modo, tras la aplicación secuencial de los moduladores se puede obtener un perfil mediante el cual se pueden calcular una serie de parámetros que resultan esenciales para definir el estado funcional de las mitocondrias (Fig.19B).

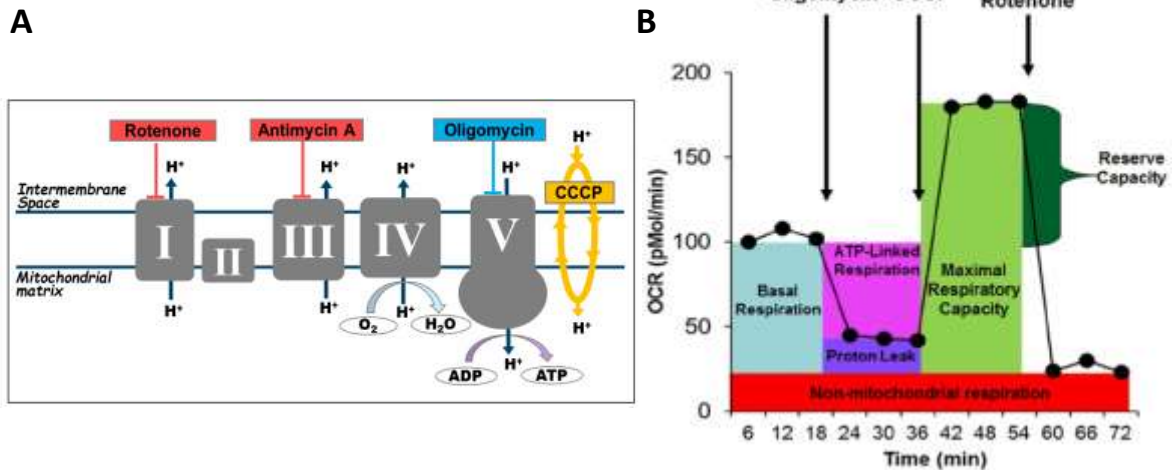


Figura 19: A) Representación de los distintos inhibidores de la cadena transportadora de electrones y su complejidad. B) Perfil obtenido al realizar la medición de la tasa de consumo de oxígeno aplicando los diferentes inhibidores de la cadena transportadora de electrones. Imágenes de la guía de usuario de *Seahorse XF* (Agilent).

Los parámetros obtenidos directamente del perfil de OCR al aplicar de manera secuencial los distintos inhibidores son:

- Respiración basal: Sin tratamiento.
- Fuga de H^+ : Tratamiento con oligomicina.
- Respiración máxima: Tratamiento con CCCP (más oligomicina).
- Respiración no mitocondrial: Tratamiento con antimicina A y rotenona (más oligomicina y CCCP).

A partir de estas medidas directas también se pueden calcular diferentes parámetros igualmente útiles para determinar la OCR, como son:

- Respiración acoplada a ATP = Respiración basal – Fuga de H^+
- Eficiencia acopladora = Respiración acoplada a ATP / Respiración basal
- *Respiratory control ratio (RCR)* = Respiración máxima / Fuga de H^+
- *Spare respiratory capacity (SCR)* = Respiración máxima – Respiración basal

Antes de llevar a cabo el ensayo, se deben sembrar las células en placas especiales en distintos pocillos de manera aleatoria, para minimizar cualquier tipo de desviación sistemática, y dejando una serie de pocillos sin sembrar, para utilizar como blanco. Para realizar el ensayo, se sigue el protocolo establecido en el Kit *Seahorse XF Cell Mito Stress Test* (Agilent). Este ensayo fue realizado en colaboración con el grupo del Dr. Francesc Villaroya (Universitat de Barcelona).

12.2. Medición mediante MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay

El kit *MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay* (Agilent) se basa en un substrato fluorescente, pero que en presencia de oxígeno no emite fluorescencia. Las células se siembran en placas de 96 pocillos, y tras la aplicación del substrato, el pocillo debe ser sellado con una capa de aceite (proporcionado en el kit) para bloquear el intercambio de oxígeno del medio con el aire. De esta forma, a medida que las células vayan consumiendo el oxígeno del medio, éste va dejando de inhibir al substrato fluorescente, y mediante un lector de placas se puede ir midiendo la fluorescencia a tiempo real, obteniendo un análisis cinético de la tasa de consumo de oxígeno.

El protocolo seguido se describe a continuación:

1. Se transfectan las células con los plásmidos que codifican para la proteína de interés y la proteína GFP (ver sección 4.9.).
2. Se separan las células transfectadas mediante citometría de flujo y se siembran en una placa de 96 pocillos (ver sección 10.).
3. Se resuspende el substrato del kit con 1ml de DMEM 4,5 g/l glucosa (puede conservarse a -20°C hasta un mes).
4. Se elimina el medio de los pocillos donde están las células y se reemplaza por 90µl de medio DMEM 4,5 g/l glucosa, excepto en los que se utilicen como controles, que se añaden 100 µl.
5. Se añade 10 µl de substrato en cada pocillo, excepto en los controles.
6. Se añaden los distintos moduladores de la respiración mitocondrial en los pocillos que corresponda a las siguientes concentraciones: oligomicina 1 µM, CCCP 10 µM, rotenona 1 µM y antimicina A 1µM.

7. Se sellan los pocillos añadiendo dos gotas de aceite mineral atemperado a 37°C en la superficie de los mismos. Se debe comprobar que los pocillos han quedado totalmente sellados y no se han generado burbujas de aire.
8. Inmediatamente, se introduce la placa en el lector de placas *Infinite M200 PRO* (TECAN) y se mide la fluorescencia (380 nm excitación y 650 nm emisión) cada minuto durante tres horas, a 37°C y ajustando los parámetros establecidos en el protocolo del kit.
9. A partir de los valores obtenidos en la lectura de fluorescencia, se genera una gráfica fluorescencia-tiempo. Para determinar el valor de la tasa de consumo de oxígeno, se mide la pendiente de la parte lineal de la gráfica.
10. Después de la lectura se elimina el medio y se añade 50 µl por pocillo del tampón de lisis *CellLytic M* para cuantificar la proteína total (ver sección 5.) de cada pocillo y normalizar el valor obtenido según el número de células de cada pocillo.

Del mismo modo que el sistema *Seahorse XF* (ver sección 12.1.), también se tratan las células con los mismos moduladores de la respiración mitocondrial. La diferencia radica en que en este caso se realiza un solo tratamiento por cada pocillo al inicio del ensayo, mientras que en el sistema *Seahorse XF* se realizan todos los tratamientos de manera secuencial y automatizada en cada pocillo. Una vez terminado el ensayo y con los valores de las pendientes obtenidas en los diferentes tratamientos con los moduladores se realizan los mismos cálculos que los detallados en el sistema *Seahorse XF* para obtener los distintos parámetros de la respiración mitocondrial.

13. Niveles de ATP

La cuantificación de ATP es una de las formas usadas para determinar el estado de funcionalidad de las mitocondrias, ya que una de las principales funciones de las mitocondrias es, justamente, la generación de ATP mediante el metabolismo oxidativo para proveer de energía a la célula, entre otras cosas.

La medida de los niveles de ATP intracelular se ha realizado mediante el kit *ATPlite Luminescence Assay System* (Perkin Elmer). Este kit se fundamenta en la reacción de

oxidación catalizada por la luciferasa, en la cual se gasta ATP para oxidar luciferina, liberando luz como producto de la reacción. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP, por lo que se puede medir la cantidad de ATP intracelular de manera indirecta, a partir de la medida de luz emitida mediante un lector de placas. Para ello, se ha seguido el protocolo descrito en el kit. Después de la lectura de luminiscencia, los valores obtenidos se normalizan por la cantidad de proteína total presente en el lisado celular que se ha utilizado para medir luminiscencia.

14. Microscopía de campo claro y de contraste de fases

La microscopía de campo claro es el método de microscopia óptica más simple y común que existe para visualizar elementos que no son visibles para el ojo humano. El microscopio de campo claro tiene gran cantidad de aplicaciones, como por ejemplo en histología, donde se usa para la observación de cortes histológicos finos teñidos, o en biología celular, para determinar la viabilidad celular en células teñidas. No obstante, no es demasiado útil para observar muestras sin teñir, ya que es necesario que las muestras se colorean para que exista un contraste con el campo claro y las distintas estructuras puedan ser observadas con mayor definición. En el caso de querer evaluar células vivas, con un microscopio convencional de campo claro resulta casi imposible observar sus detalles y estructuras, y la adición de colorantes en ocasiones es incompatible con la viabilidad. Por ello, se usan microscopios de contraste de fases, mediante los cuales la luz se manipula de tal forma que se pueden observar en detalle muestras vivas sin necesidad de usar técnicas de tinción.

14.1. Seguimiento, viabilidad y contaje de cultivos celulares

Debido al uso de cultivos primarios de neuronas corticales y de líneas celulares para el desarrollo de este trabajo, es necesario realizar un seguimiento de los cultivos para comprobar que las condiciones en las cuales se trabaja son óptimas para los mismos. Este hecho es importante sobre todo en el caso de los cultivos primarios de neuronas corticales debido a su gran sensibilidad frente a variaciones en su preparación y en sus medios de mantenimiento. Por lo tanto, después de la realización de los cultivos primarios o de manipulaciones realizadas en los mismos, y antes de realizar cualquier

experimento, se ha observado mediante microscopia de contraste de fases, que las neuronas seguían vivas y en buenas condiciones. Si se ha observado cualquier cambio que denota que las neuronas podrían estar en apoptosis o sufriendo cualquier tipo de problema, el cultivo se ha descartado. De la misma forma se ha hecho en las líneas celulares, para evitar realizar cualquier experimento en que las células no se encuentren en las condiciones adecuadas. Además, en las líneas celulares, al realizar las siembras en las placas con pocillos para llevar a cabo los experimentos, se ha realizado el conteo de las mismas, para llevarlos a cabo siempre con el mismo número de células, evitando que éstas llegaran a un estado de confluencia en los pocillos. Para ello se han seguido los siguientes pasos:

1. Siguiendo desde el paso 8 de la sección 3.3., se toman 10 µl de la suspensión celular, y se cargan en una cámara de Neubauer. Si se desea calcular la viabilidad, previamente a la carga en la cámara de Neubauer, se mezclan los 10 µl de la suspensión celular con 10 µl del colorante azul de tripano. Este colorante no se incorpora a las células viables porque no es capaz de atravesar su membrana intacta, pero sí tiñe las células muertas, las cuales presentan una membrana comprometida.
2. Tras cargar las células en la cámara de Neubauer, se realiza el conteo de células presentes en los cuatro cuadrantes de la misma.
3. Se calcula la media de las células contadas en los cuatro cuadrantes y se multiplica por 10.000 para obtener el número de células por mililitro que hay en la suspensión celular. En el caso de haber añadido azul de tripano, también debe multiplicarse por 2, dado que se ha diluido 1:1 con el colorante.

14.2. Análisis morfométricos neuronales

En este trabajo, se han llevado a cabo análisis morfométricos neuronales a partir de cortes histológicos de cerebros de ratones $Mfn2^{lox/lox}UBC-CRE-ERT2^{+/-}$ a diferentes estadios. Por un lado se han utilizado ratones a día P13, a los cuales se les había inyectado previamente tres dosis de tamoxifeno entre los días P1 y P5. Por otro lado, se han utilizado ratones adultos de 9 meses, a los cuales se les había administrado un mes antes tamoxifeno. En ambos casos la administración de tamoxifeno tiene como

objetivo disminuir *in vivo* la expresión de Mfn2. Estos cortes histológicos se han teñido mediante la tinción de Golgi (ver sección 9.1.) y las imágenes han sido tomadas por microscopía de campo claro con la ayuda de un microscopio Olympus BX61 acoplado a una cámara Olympus DP70.

Ramificación neurítica

El primer parámetro analizado ha sido la ramificación neurítica. Para ello, se han tomado imágenes de diferentes neuronas de los diferentes cortes histológicos obtenidos, con el objetivo 20x, para evaluar posibles cambios en su árbol neurítico. Una vez obtenidas las imágenes se ha realizado un análisis de Sholl, un método de análisis cuantitativo utilizado comúnmente para la caracterización morfológica neuronal (Bird & Cuntz 2019). Este análisis se fundamenta en generar círculos concéntricos a una distancia determinada, siendo el soma de la neurona el centro de los mismos, y contar el número de ramas neuríticas que hacen intersección con cada uno de dichos círculos. Por lo tanto, a más intersecciones, más ramificación de las neuritas existe.

Este análisis se ha realizado con el software *ImageJ* de la siguiente manera:

1. Se carga la imagen en formato TIFF en el software *Image J*.
2. Se transforma la imagen a escala de grises 8-bit: Image>Type>8-bit.
3. Se invierte la escala de grises: Edit>Invert.
4. Se traza el árbol neurítico con el *plugin* “*Simple neurite tracer*”, marcando el inicio y final de la extensión. Si el trazo realizado es correcto se pulsa la tecla “y” para confirmarlo, si no se pulsa “n”. Cuando se ha trazado por completo todo el árbol neurítico, se pulsa la tecla “f”.
5. Se selecciona una de las extensiones y se pulsa la tecla “g”. Sin dejar de pulsarla se mueve el cursor (solo se moverá a través de la extensión) hasta situarlo en el soma de la neurona y se pulsan las teclas “Control+Alt+Shift+a” para realizar en análisis de Sholl centrado en el soma.
6. Se despliega un menú en el cual se seleccionan las opciones “*Use standard axes*” y “*No normalization of intersections*”. Se indica el valor “*Radius step*”

size”, es decir, la distancia que hay entre círculo, siendo de $10\mu\text{m}$ en este trabajo.

7. Se obtiene el resultado representado en un gráfico que relaciona distancia desde el soma y número de intersecciones.

Espinas dendríticas

El segundo parámetro analizado han sido las espinas dendríticas, concretamente su grosor, longitud y densidad, las tres medidas más comúnmente analizadas para el estudio de las mismas. Para ello, se han utilizado las imágenes tomadas para el estudio de la ramificación neurítica (ver sub-apartado correspondiente) y también se ha utilizado el software *ImageJ*. El análisis de las espinas dendríticas se ha realizado de la siguiente manera:

1. Primeramente hay que tener en cuenta que en las medidas de distancia que realicemos, el valor obtenido será el número de píxels que hay en esa distancia, no la distancia real. Por lo tanto, utilizando el mismo objetivo que en las imágenes, se debe tomar una imagen de una cámara de Neubauer (cuya distancia real entre líneas es conocida), para relacionar la distancia en píxels con la distancia real (μm) mediante un sencillo factor de conversión.
2. Se carga la imagen en formato TIFF en el software *Image J*.
3. Se escoge al azar una sección de una de las neuritas de una neurona y se mide, trazando una línea y pulsando “m”. A partir de la distancia en píxels y el cálculo hecho previamente para conocer la distancia real, se calcula la distancia real de la sección. Se cuenta el número de espinas presentes en dicha sección y se divide entre la distancia de la misma, para obtener el valor de densidad (número espinas/ μm).
4. En cada una de las espinas contadas, se traza una línea para medir la longitud y grosor (siempre por la parte más gruesa para establecer un mismo criterio para todas las espinas) de las mismas. Del mismo modo que en el punto anterior, el valor obtenido es la distancia en número de píxels, la cual hay que transformar a distancia real (μm) con el factor de conversión.

15. Microscopía de fluorescencia y confocal

En la microscopía de fluorescencia, el microscopio incorpora una lámpara especial que emite rayos de luz de una determinada longitud de onda, que son capaces de excitar los fluorocromos con los cuales se ha tratado la muestra previamente. Estos fluorocromos, al excitarse emiten fotones de mayor longitud de onda, que pueden ser visualizados mediante distintos filtros, permitiendo observar una coloración distinta según el tipo de fluorocromo, con altos niveles de sensibilidad y resolución microscópica. De esta forma, se puede obtener información que generalmente pasa desapercibida en un microscopio sin fluorescencia. No obstante, para obtener una imagen nítida, la muestra debe ser lo más delgada posible. Si se observa una muestra gruesa y se requiere una observación con gran detalle, la imagen se ve deteriorada a causa de la superposición de los elementos que están tanto por debajo como por encima del plano enfocado, los cuales se ven borrosos o mal enfocados. Este hecho, además, provoca que se pierda la información tridimensional de la muestra.

Por lo tanto, si se requiere analizar de manera detallada las estructuras internas de la célula, como es el caso de algunas aproximaciones de este trabajo, es necesario el uso de microscopía confocal. Esta técnica, en lugar de iluminar la muestra de forma global, permite iluminarla de forma sucesiva en diferentes secciones ópticas por todo su volumen, reconstruyendo la imagen al final de proceso, de manera similar al escaneado que se produce en los microscopios electrónicos de barrido. De esta forma, es posible realizar análisis tridimensionales u observar con alta resolución estructuras internas de las células, como son los orgánulos.

Durante la realización de este trabajo se ha utilizado un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 acoplado a una cámara Olympus DP70, un microscopio de fluorescencia invertido Leica DM IRB acoplado a una cámara Leica DFC550 y un microscopio confocal Zeiss LSM 880, ubicado en el servicio de Microscopía Óptica Avanzada de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona.

15.1. Fijación de muestras con paraformaldehído

Para las muestras en las que no se requiera hacer una observación *in vivo* del parámetro a analizar, se realizará una fijación con paraformaldehído (PFA) 4%. Este proceso permite la conservación tanto de la estructura celular como de los elementos intracelulares y evita la autólisis, manteniendo durante largos periodos de tiempo un estado similar al estado que presentaba *in vivo*. Las células que deben fijarse para ser observadas por microscopía se han sembrado encima de cubreobjetos de cristal, colocados en el interior de los pocillos antes de la siembra, o del *coating* en el caso de las neuronas.

Para llevar a cabo la fijación y el montaje de los cubreobjetos se realizan los siguientes pasos:

1. Se elimina el medio de los pocillos y se añade 250 μ l por pocillo de tampón de fijación PFA 4%.
2. Se conserva durante 20 minutos protegido de la luz.
3. Se aspira el tampón de fijación PFA 4% y se realizan 3 lavados con PBS 1X.
4. Con la ayuda de una pipeta, se depositan gotas (4 μ l) de *VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI* (Vector Laboratories) separadas las unas de las otras sobre un portaobjetos debidamente rotulado. El DAPI, además de permitir visualizar los núcleos de las células, permite determinar la viabilidad de las mismas (ver sección 15.8.), si es el caso.
5. Con la ayuda de unas pinzas, se sacan con cuidado los cubreobjetos y se depositan encima las gotas. Es importante, que la cara del cubreobjetos donde se encuentran las células sea la que queda en contacto con la gota y el portaobjetos.
6. Los portaobjetos pueden conservarse durante largos periodos de tiempo a 4°C y protegidos de la luz.

15.2. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica inmunoquímica analítica que usa anticuerpos conjugados a fluorocromos y aprovecha la capacidad de estos anticuerpos para unirse

con alta especificidad a un determinado antígeno. Por lo tanto, allí donde se encuentre el antígeno, se observará marcaje por fluorescencia. Para este trabajo, se ha utilizado un método indirecto, es decir, se ha utilizado un anticuerpo primario que reconoce el antígeno de interés y un anticuerpo secundario que reconoce al primario, por lo que se produce un efecto de amplificación que aumenta la sensibilidad de la técnica. Además, se han utilizado anticuerpos secundarios conjugados a biotina y posteriormente estreptavidina conjugada a un fluorocromo, por lo que usando los beneficios de la interacción estreptavidina-biotina, una unión altamente afín y fuerte, se ha podido amplificar aún más la señal fluorescente recibida.

Las células a las cuales se ha realizado inmunofluorescencia se han sembrado sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro, colocados en el interior de los pocillos de placas de 24 pocillos antes de realizar la siembra, o del *coating* en el caso de las neuronas. Por lo tanto, todo el proceso descrito a continuación se realiza en la misma placa:

1. Se lleva a cabo la fijación de las células (ver sección 15.1., hasta el paso 3).
2. Se elimina el PBS 1X y se incuba las células durante 5 minutos con PBS 1X + Nonidet P40 0,5% para permeabilizar las membranas celulares.
3. Se realizan 3 lavados con PBS 1X.
4. Se añaden 250 μ l de solución de bloqueo (PBS 1X + BSA 3%) y se incuba en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Se aspira la solución de bloqueo y se añade 250 μ l por pocillo de anticuerpo primario (preparado en solución de bloqueo + azida 1:500). Se incuba en agitación a 4°C hasta el día siguiente.
6. Se recupera el anticuerpo primario (al añadir azida se evita el crecimiento de microorganismos y permite su reutilización, conservándolo a 4°C) y se realizan 3 lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.
7. Se añade 250 μ l por pocillo de anticuerpo secundario conjugado a biotina (preparado en solución de bloqueo) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Se elimina el anticuerpo secundario y se llevan a cabo 3 lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

9. Se añade 250 μ l por pocillo de estreptavidina conjugada al fluorocromo de interés (preparado en solución de bloqueo) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
10. Se elimina la estreptavidina y se llevan a cabo 3 lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.
11. Se montan los cubreobjetos en un portaobjetos (ver sección 15.1., del paso 4 al 6).

Para el montaje de las imágenes representativas, se sigue el proceso descrito a continuación:

1. Se cargan las imágenes en el *software* ImageJ y se realiza la siguiente acción: Image>Color>Split Channels. De esta forma se obtiene un *stack* de imágenes por separado por cada tipo de canal de fluorescencia con los que se han tomado las imágenes.
2. Se fusionan los canales de fluorescencia rojo y verde en un solo *stack* que contenga ambos canales: Image>Color>Merge Channels. Se abre una ventana donde se debe seleccionar el *stack* que corresponda a cada color.
3. Se transforma el *stack* en una única imagen que recopile la información de todas las imágenes del *stack*: Image>Stacks>Z Project.

15.3. Potencial de membrana mitocondrial

Dado que mediante la fosforilación oxidativa la cadena de transporte electrónico genera un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna que se utiliza para la síntesis de ATP, la medida del potencial de membrana mitocondrial permite determinar el estado de funcionalidad mitocondrial. Para ello se utiliza la sonda fluorescente roja *tetramethylrhodamine methylester* (TMRM; Sigma), la cual es capaz de penetrar en las mitocondrias en función de su potencial de membrana. Por lo tanto, a mayor potencial de membrana, mayor señal de fluorescencia. La medición de la fluorescencia se realizó con un microscopio de fluorescencia Leica DM IRB acoplado a una cámara Leica DFC550.

El proceso seguido se detalla a continuación:

1. Se aspira el medio de los pocillos donde están las células y se realiza un lavado con 0,5 ml de medio SGG sin calcio, magnesio ni rojo de fenol.
2. En un tubo, se prepara 1 ml de medio SGG sin calcio, magnesio ni rojo de fenol por pocillo y se añade TMRM a una concentración de trabajo de 6 nM.
3. Se resuspende bien la solución, se elimina el medio de los pocillos y se añade 1 ml por pocillo.
4. Se incuba durante 30 minutos a 37°C en la incubadora.
5. Mientras tanto, se enciende el microscopio de fluorescencia y se abre el software para tenerlo todo preparado para cuando se tengan que tomar imágenes.
6. Pasada la incubación, se realiza un nuevo lavado con 0,5 ml de medio SGG sin calcio, magnesio ni rojo de fenol y finalmente se añade 1 ml por pocillo.
7. Se toman imágenes con el microscopio para fluorescencia roja (TMRM) y verde (GFP) en diferentes campos por pocillo (aunque siempre para un mismo campo se debe tener una imagen de TMRM y otra de GFP). De este modo, el GFP sirve para marcar qué células son las que se han transfectado con la proteína de interés, y son las que posteriormente se analizarán.
8. Una vez tomadas las imágenes, se aplica 1 μ l CCCP 1000X (concentración de trabajo 10 μ M) al pocillo y se toman de nuevo imágenes. De este modo, el CCCP despolariza totalmente las mitocondrias y la fluorescencia captada consiste en el marcaje inespecífico de la sonda.

Una vez tomadas las imágenes, se procede a su análisis mediante el software *ImageJ*:

9. Se cargan las imágenes de TMRM y GFP tomadas en el mismo campo en formato TIFF en el software *Image J*.
10. Se transforma la imagen de TMRM a escala de grises 8-bit: Image>Type>8-bit.
11. Se abre la imagen de GFP y se traza un círculo 12:12 (longitud:anchura), que conformará el "ROI" (región de interés). Se va moviendo el ROI sobre las células marcadas con GFP y se pulsa la tecla "t", guardando de esta manera las coordenadas de cada célula en una ventanita que se abre a parte. Se guardan las coordenadas de 10 células.

12. Se abre la imagen de TMRM y se pulsa sobre la primera coordenada de la ventanita. Al hacerlo, aparecerá el ROI en esta imagen, en la posición marcada en la imagen anterior. Se pulsa “*m*” para obtener el valor de la intensidad de fluorescencia. Después, se aprieta a la siguiente coordenada y se repite el proceso, y así sucesivamente. Además, en cada imagen, se toma la medida en un lugar donde no hayan células, para obtener el *background*.
13. Para cada condición se ha medido un mínimo de 10 células por imagen, de 3 imágenes distintas por condición (y de distintos pocillos).
14. Una vez obtenidos todos los valores, se resta el *background* de cada imagen a los valores obtenidos. De esta manera, se elimina la señal del *background*.
15. Se resta las medidas de las imágenes tomadas tras aplicar CCCP a las medidas tomadas antes de aplicar CCCP. De esta manera, se elimina el marcaje inespecífico de la sonda.
16. Finalmente, se relativizan los valores obtenidos en cada una de las condiciones analizadas con la condición control.

15.4. Colocalización mitocondria-RE mediante coeficiente de Manders

En microscopía de fluorescencia o confocal, el término colocalización se refiere a la observación de superposición espacial entre dos o más marcajes fluorescentes distintos, teniendo cada uno de ellos una longitud de onda de emisión distinta. De este modo, si ambos marcajes se superponen espacialmente, los elementos a los cuales están marcando se considera que están localizados en el mismo punto, o en puntos muy cercanos. Debido a las diferentes formas matemáticas y bioinformáticas para abordar la interpretación y cálculo de colocalización, hay gran cantidad de *softwares*, algoritmos y herramientas distintas para determinar cuan relacionados están dos elementos espacialmente, todos ellos con sus ventajas y desventajas. Por ello, tras consultar con el técnico del servicio de Microscopía Óptica Avanzada de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona, se decidió utilizar el coeficiente de Manders por su capacidad de discernir matemáticamente el solapamiento entre ambas señales fluorescentes.

Este coeficiente se basa en el fenómeno de correlación, el cual presenta una relación estadística mucho más significativa entre fluoróforos como indicadores de interacción biológica que por ejemplo el fenómeno de co-ocurrencia, también utilizado para determinar relaciones espaciales entre elementos. Para realizar el análisis, se ha utilizado el *plugin "JaCOP"* (Bolte & Cordelières 2006) del *software ImageJ*.

Dado que el objetivo de este trabajo es determinar el grado de colocación entre mitocondrias y RE, las células han sido co-transfectadas con GFP dirigido al RE y RFP dirigido a las mitocondrias, dos proteínas que emiten fluorescencia a distinta longitud de onda. El proceso se ha llevado a cabo de la siguiente manera:

1. Se siembran las células sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm en una placa de 24 pocillos.
2. Al día siguiente se co-transfectan (ver sección 4.9.) con GFP dirigido al RE, RFP dirigido a mitocondrias y el plásmido que codifica la proteína de interés. En neuronas la transfección se lleva a cabo a DIV4, o en otro momento si se especifica.
3. A las 48 horas se fijan las células y se montan los cubreobjetos en portaobjetos (ver sección 15.1.). En neuronas la fijación se lleva a cabo tras 72 horas.
4. Se toman imágenes mediante microscopía confocal (microscopio confocal Zeiss LSM 880) de células individuales con el objetivo 63x, tanto para el canal de fluorescencia verde (GFP) como para el de roja (RFP). Estas imágenes deben ser tomadas en forma de *stack*, es decir, un conjunto de imágenes de distintas secciones transversales de la célula, que permitan su reconstrucción en 3 dimensiones. De este modo, se obtiene información de la célula en todo su volumen y no solo de un plano en concreto.
5. Una vez tomadas las imágenes, se cargan en el *software ImageJ* en formato TIFF y se separan los distintos canales de fluorescencia: Image>Color>Split Channels. De esta forma obtendremos un *stack* de imágenes sólo con la fluorescencia verde y otro solo con la roja.
6. Se abre el *plugin JaCOP*: Plugins>JaCOP y se seleccionan los dos *stacks* que hemos separado (y que provienen de la misma imagen), cada uno en una de las pestañitas.

7. Se procede al análisis, obteniendo dos valores. Uno es el valor de GFP que colocaliza con RFP y el otro el valor de RFP que colocaliza con GFP. Para este estudio, nos interesa el valor de mitocondrias (RFP) que colocalizan con RE (GFP), por lo tanto, este es el coeficiente escogido.

Para el montaje de las imágenes representativas, se sigue el proceso descrito a continuación a partir de las imágenes obtenidas en el punto 5:

8. Se fusionan los dos canales de fluorescencia en un solo *stack* que contenga ambos canales: Image>Color>Merge Channels. Se abre una ventana donde se debe seleccionar el *stack* que corresponda a cada color.
9. Se transforma el *stack* en una única imagen que recopile la información de todas las imágenes del *stack*: Image>Stacks>Z Project.

Por otro lado, también se ha valorado la colocalización en los ensayos de reclutamiento de Bax y LC3 hacia las mitocondrias. En estos ambos casos se usaron plásmidos que codificaban para estas proteínas conjugadas con GFP. De este modo modo, siguiendo el procedimiento descrito en este apartado, se co-transfectó con Bax-GFP o LC3-GFP y mito-RFP.

15.5. Morfología mitocondrial

Para el estudio de la morfología mitocondrial, se han utilizado los mismos cubreobjetos usados para analizar colocalización mitocondria-RE mediante coeficiente de Manders (ver sección 15.4.), ya que contienen células fijadas que expresan RFP dirigido a las mitocondrias. Por lo tanto, se ha seguido el mismo proceso que en la sección anterior y se han tomado imágenes mediante microscopía confocal (pasos del 1 al 4). Si en algún caso se ha analizado morfología mitocondrial pero no colocalización, el proceso ha sido también el mismo, pero sin añadir en la transfección el plásmido que codifica para GFP dirigido al RE.

Para la determinación de la morfología mitocondrial se han medido tres parámetros distintos. Por un lado, se determinó el porcentaje de células que poseen mitocondrias con aspecto globular, las cuales definen un estado de fraccionamiento mitocondrial. Por otro lado, se determinó el “*Aspect Ratio*”, para el cual se midieron los ejes mayor y

menor de cada mitocondria de manera individual, obteniendo un valor más alto cuanto más alargada sea la mitocondria:

$$\textit{Aspect Ratio} = \frac{\textit{Eje mayor}}{\textit{Eje menor}}$$

Por último, se analizó la circularidad, para la cual se midió el área y el perímetro de cada mitocondria de manera individual, siendo 1 el valor de máxima circularidad y 0 el de mínima circularidad. Por lo tanto, cuanto más cercano a 0, más se relaciona con una morfología tubular:

$$\textit{Circularidad} = \frac{4 \times \pi \times \textit{Área}}{\textit{Perímetro}^2}$$

Para las imágenes representativas y su análisis, tal como se ha comentado, se han aprovechado las imágenes tomadas para analizar colocación mitocondria-RE mediante coeficiente de Manders, detallado en la sección anterior (paso 4). Para ello, se ha transformado el *stack* en forma de una sola imagen, para representar en ella la información tridimensional recopilada en las diferentes imágenes del *stack*. El proceso se detalla a continuación:

1. Se carga la imagen en el *software ImageJ* en formato TIFF y se separan los distintos canales de fluorescencia: Image>Color>Split Channels. Se mantiene el *stack* de imágenes que representan la fluorescencia roja (RFP) y se cierra el resto.
2. Se transforma el *stack* en una única imagen que recopile la información de todas las imágenes del *stack*: Image>Stacks>Z Project.

15.6. Medidas de Ca²⁺

El Ca²⁺ es un conocido mensajero que regula vías celulares con multitud de funciones distintas, modificando dinámicamente su concentración en los distintos compartimentos intracelulares de manera muy precisa para desempeñar su función de manera correcta. Durante este trabajo se han realizado diferentes medidas de Ca²⁺ para determinar cómo varía en distintas condiciones la cantidad de Ca²⁺ en estos compartimentos intracelulares.

Para poder observar estos cambios, se han utilizado métodos de análisis basados en fluorescencia, usando sondas o proteínas fluorescentes sensibles a los cambios de Ca^{2+} exclusivamente en ciertos compartimentos intracelulares. Además, se han utilizado moléculas capaces de promover la salida del Ca^{2+} almacenado en retículo endoplasmático, como son la cafeína, el ATP y la histamina, o en mitocondrias, como es el CCCP. Mediante la toma continua de imágenes durante un cierto periodo de tiempo tras la aplicación de estas moléculas por microscopía confocal, se ha podido monitorizar *in vivo* la dinámica del Ca^{2+} en estos orgánulos en distintas condiciones.

Para estos experimentos, las células han sido sembradas en placas de 35 mm especiales para microscopía (MatTek Corporation) que contienen ensamblado en la superficie en la cual crecen un cubreobjetos de cristal. De esta forma, se pueden tomar imágenes *in vivo* mediante microscopía confocal de manera óptima. Las transfecciones se han realizado 48 horas antes de los experimentos, y para seleccionar las células transfectadas se ha co-transfectado con GFP o RFP, según la sonda empleada (para no interferir con la fluorescencia propia de la sonda).

Ca²⁺ citoplasmático

Para la determinación del Ca^{2+} citoplasmático se ha utilizado la sonda *Fluo-4* (Thermo Fisher Scientific), la cual penetra en el citoplasma celular, pero no el interior de los orgánulos, y presenta un aumento de fluorescencia cuando se puede unir a Ca^{2+} . Esta sonda se excita a 488 nm y emite fluorescencia verde. El proceso que se ha seguido para determinar el Ca^{2+} citoplasmático se detalla a continuación:

1. Se retira el medio de las placas.
2. Se lava 3 veces con solución HBSS (con glucosa y HEPES).
3. Se añade 0,5 ml de Fluo-4 AM 2 μ M (el stock está preparado a 1 mM en Pluronic F-127 al 20% en DMSO).
4. Se incuba durante 45 minutos a temperatura ambiente.
5. Se retira la sonda lavando 3 veces con solución HBSS.
6. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente con 1,5 ml HBSS.
7. Se procede a la toma de imágenes.

Ca²⁺ mitocondrial

Para medir la cantidad de Ca²⁺ mitocondrial se han utilizado dos métodos distintos. El primero es la sonda *Rhod-2* (Thermo Fisher Scientific), una sonda comúnmente usada en el mundo de la investigación para estudiar Ca²⁺ mitocondrial, ya que se dirige específicamente al interior de las mitocondrias y su emisión de fluorescencia es proporcional a su unión al Ca²⁺. Esta sonda se excita a 552 nm y emite fluorescencia roja. El proceso seguido para medir Ca²⁺ mitocondrial se describe a continuación:

1. Se retira el medio de las placas.
2. Se lava 3 veces con solución HBSS (con glucosa y HEPES).
3. Se añade 1 ml de Rhod-2 AM 5µM (el stock está preparado a 1mM en Pluronic F-127 al 20% en DMSO).
4. Se incuba durante 30 minutos a 4°C.
5. Se retira la sonda lavando 3 veces con solución HBSS.
6. Se incuba durante 20 minutos a 37°C con 1,5 ml HBSS.
7. Se procede a la toma de imágenes.

En segundo lugar se ha utilizado un plásmido que codifica para el sensor de Ca²⁺ dirigido a las mitocondrias "*Cepia3mt*" (58219, Addgene), la cual se dirige específicamente al interior de las mitocondrias y emite fluorescencia verde (GFP) en función de su unión con el Ca²⁺. Para realizar el ensayo, se ha transfectado dicha proteína y a las 48 horas se han llevado a cabo los siguientes pasos:

1. Se retira el medio de las placas.
2. Se lava 3 veces con solución HBSS (con glucosa y HEPES), dejando las placas con 1,5 ml HBSS tras el último lavado.
3. Se procede a la toma de imágenes.

Ca²⁺ del retículo endoplasmático

Para analizar el Ca²⁺ del retículo endoplasmático se ha utilizado un plásmido que codifica para el sensor de Ca²⁺ localizado en el RE "*ER-LAR-GECO1*" (61244, Addgene). Este indicador de calcio se basa en una proteína fluorescente roja (RFP) dirigida al retículo endoplasmático, fusionada a calmodulina y a una región peptídica reguladora.

De este modo, cuando se excita a 552 nm y la calmodulina (proteína receptora de Ca^{2+} con alta afinidad y unión reversible) se une a Ca^{2+} , la región reguladora adopta una conformación que permite la emisión de fluorescencia roja. En cambio, cuando no se une a Ca^{2+} , adopta una conformación que no permite la emisión de ningún tipo de fluorescencia. El proceso que se ha seguido para medir el Ca^{2+} del retículo endoplasmático se detalla a continuación:

1. Se retira el medio de las placas.
2. Se lava 3 veces con solución HBSS (con glucosa y HEPES), dejando las placas con 1,5 ml HBSS tras el último lavado.
3. Se procede a la toma de imágenes.

15.7. Análisis morfométricos neuronales

Del mismo modo que se han realizado análisis morfométricos neuronales *in vivo* mediante microscopia de campo claro (ver sección 14.2.), también se ha realizado este tipo de análisis mediante microscopia de fluorescencia. En este caso, se ha llevado a cabo una aproximación *in vitro* en cultivos primarios de neuronas corticales de estos mismos ratones. Para ello, previamente se han sembrado los cultivos neuronales sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm en placas de 24 pocillos y se han co-transfectado (ver sección 4.9.) con plásmidos que codifican para GFP y la proteína de interés a DIV4. Tras la transfección, los cultivos se han tratado con tamoxifeno (ver sección 2.5.) y AraC (ver sección 2.4.), y después de 72 horas, son fijados con paraformaldehído (ver sección 15.1.) y se realiza una inmunofluorescencia (ver sección 15.2.) utilizando un anticuerpo primario anti-GFP y estreptavidina conjugada al fluorocromo *Alexa Fluor 488*. De este modo, la expresión de fluorescencia verde de GFP amplificada con el uso del fluorocromo verde de la inmunofluorescencia permite visualizar de manera clara todo el citoplasma neuronal, tanto soma como axón y dendritas.

Las imágenes se han tomado con un objetivo 4X con la ayuda del microscopio Olympus B61 acoplado a una cámara Olympus DP70y se han procesado con el *software ImageJ*. Antes de realizar los análisis morfométricos, dado que en la mayoría de los casos todas las extensiones neuronales no pueden ser abarcadas en una sola imagen, se deben tomar varias imágenes por separado de una misma neurona y luego ensamblarlas en

un montaje de imágenes. Para ello, se utiliza el *plugin Grid/Collection stitching* (*Plugins>Stiching>Grid/Collection stitching*) de *ImageJ*, en el cual deben seleccionarse las imágenes a ensamblar, y el propio *software* detecta la posición de cada una por solapamiento. Estas imágenes ensambladas son utilizadas tanto para el análisis de ramificación como de longitud neurítica, descritos a continuación.

Ramificación neurítica

El primer parámetro analizado es la ramificación de las extensiones de las neuronas que se han co-transfectado con plásmidos que codifican para GFP y la proteína de interés para este análisis, para evaluar posibles cambios en su árbol neurítico en diferentes condiciones. A partir de las imágenes tomadas a 4X y ensambladas en una única imagen, se lleva a cabo un análisis de Sholl de la misma forma descrita en el análisis de la ramificación neurítica por microscopía óptica (ver sección 14.2.).

Longitud neurítica

El segundo parámetro analizado es la longitud neurítica. Para ello, se han utilizado las mismas imágenes ensambladas que se han usado en el apartado anterior, siguiendo el proceso (ver sección 14.2.) hasta el paso 4. A partir de ese punto, se lleva a cabo la medida de la longitud de los trazos neuríticos realizados mediante el comando *Analysis>Measure Paths...* del *plugin "Simple neurite tracer"*. Al hacer esto, aparece una tabla con la longitud de cada trazo realizado, los cuales corresponden a la longitud de las neuritas. Por lo tanto, el último paso consiste en sumar la longitud de todos los trazos, para obtener la longitud neurítica total.

15.8. Determinación de la viabilidad

Durante el proceso de fijación y montaje de las muestras celulares (ver sección 15.1.), se utiliza un medio de montaje que lleva incorporado 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Este compuesto químico con carácter fluorescente puede unirse al surco menor del ADN de doble cadena, preferiblemente en regiones enriquecidas con adenina y timina. De esta manera, al excitar la muestra con un láser UV se observan los núcleos con fluorescencia de color azul, entre los cuales se puede diferenciar núcleos sanos y núcleos picnóticos. Estos últimos son producto de condensaciones irreversibles

de la cromatina, aparecidas en las células como consecuencia de procesos de necrosis o apoptosis, por lo que van a permitir determinar la viabilidad de las mismas. La observación de los núcleos se realizó mediante un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 acoplado a una cámara Olympus DP70.

16. Microscopia electrónica de transmisión

La microscopia electrónica de transmisión es una técnica que permite observar con gran detalle estructuras internas de la célula, incluso a nivel molecular. Esta técnica se basa en la emisión de un haz de electrones que se dirige hacia una muestra ultra fina. De manera muy resumida, una parte de los electrones pasan a través de la muestra, mientras que otros rebotan, según sus características, generando así una imagen aumentada de la estructura de la muestra. Gracias a que los electrones poseen una longitud de onda mucho menor que la luz, se pueden observar estructuras mucho más pequeñas.

Para llevar a cabo los análisis de los contactos RE-mitocondrias mediante microscopia electrónica de transmisión, se siguió este procedimiento:

1. Se siembran 150.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos.
2. Al día siguiente, se co-transfectan con GFP y la proteína de interés (ver sección 4.9.).
3. A las 48 horas, se separan las células transfectadas mediante citometría de flujo (ver sección 10.).
4. Se siembran de nuevo las células separadas en placas de 6 pocillos, y tras 24 horas se fijan con glutaraldehído 2,5% en tampón fosfato Sörensen (0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,2) durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Se levantan las células mediante *scrapping* y se centrifugan a 2500 rpm durante 5 minutos.
6. Se realizan tres lavados del *pellet* con tampón fosfato Sörensen.
7. Se traslada el *pellet* al servicio de microscopía electrónica de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona, donde es procesado por el servicio técnico.

8. Una vez terminado el procesado, a partir de las secciones de 60 nm obtenidas, se toman imágenes mediante la cámara 1Kx1K Megaview CCD, acoplada al microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010.

El montaje de las imágenes representativas y el análisis de los contactos se llevan a cabo mediante el software *ImageJ*. Por un lado, se ha medido la distancia media de todos los contactos entre mitocondrias y RE que se consideran MAMs, es decir, de una distancia máxima de 80 nm, trazando varias líneas entre las membranas de ambos orgánulos y midiendo su longitud. Por otro lado, se determinó el porcentaje de mitocondrias que establecían contactos con el RE en tres rangos distintos, según la distancia del contacto: menor de 25 nm, entre 25-50 nm y entre 50-80 nm.

17. Materiales, equipos y servicios utilizados

En los siguientes apartados se describen de manera detallada los materiales, tanto biológicos como no biológicos, utilizados para el desarrollo de este trabajo y que aparecen en los métodos aquí descritos.

17.1. Anticuerpos primarios

Nombre	Especie	Concentración	Técnica	Fabricante	Referencia
Anti-Actina	Ratón	1:1000	Western Blot	Sigma	A4700
Anti-Drp1	Ratón	1:1000	Western Blot	BD Biosciences	611112
Anti-eIF2 α	Conejo	1:1000	Western Blot	Abcam	Ab242148
Anti-p-eIF2 α	Conejo	1:200	Western Blot	Santa Cruz Biot.	sc-101670
Anti p-ERK	Conejo	1:1000	Western Blot	Cell Signaling	#4377S
Anti-GFAP	Conejo	1:500	Western Blot	DAKO	Z0334
Anti-GFP	Conejo	1:1000/ 1:750	Western Blot/ Inmunofluorescencia	Invitrogen	A11122
Anti-HSP60	Conejo	1:2000	Western Blot	Abcam	Ab190828
Anti-MCU	Conejo	1:1000	Western Blot	Cell Signaling	#14997
Anti-Mfn1	Conejo	1:500	Western Blot	Santa Cruz Biot.	sc-50330
Anti-Mfn2	Ratón	1:2000	Western Blot	Abcam	Ab56889
Anti-c-Myc	Ratón	1:500/ 1:500	Western Blot/ Inmunofluorescencia	Sigma	M4439
Anti-Opa1	Ratón	1:1000	Western Blot	BD Biosciences	612606
Anti-PDH	Conejo	1:1000	Western Blot	Cell Signaling Tech.	#3205
Anti-p-PDH	Conejo	1:1000	Western Blot	Abcam	Ab177461
Anti-RFP	Ratón	1:500	Western Blot	RockLand	200-301-379
Anti-VDAC	Ratón	1:1000	Western Blot	Abcam	Ab14734

17.2. Anticuerpos secundarios

Nombre	Especie	Concentración	Técnica	Fabricante	Referencia
Anti-Mouse-HRP	Cabra	1:5000	Western Blot	Sigma	A4416
Anti-Rabbit-HRP	Cabra	1:5000	Western Blot	Sigma	A6154
Biotin-SP-conjugated Anti-Mouse	Asno	1:200	Inmunofluorescencia	Jackson Immuno R.	715-065-150
Biotin-SP-conjugated Anti-Rabbit	Asno	1:200	Inmunofluorescencia	Jackson Immuno R.	711-065-152

17.3. Plásmidos

Nombre	Origen	Resistencia	Descripción
ATF6-Rluc	Addgene 11976	Amp	Luciferasa Renilla bajo el control del promotor de ATF6
Bax-GFP	Addgene (19741)	Kan	Bax fusionada a GFP
Cepia3mt	Addgene (58219)	Amp	Proteína fluorescente verde indicadora de calcio intramitocondrial
ChiMERA	Dr. Peter Walter	Amp	Proteína artificial enlazadora RE-mitocondrias
DN-Drp1	Dr. A. M. van der Bliek	Amp	Dominante negativo de la proteína mitocondrial Drp1
ER-GFP	Addgene 121159	Kan	Proteína fluorescente verde dirigida al retículo endoplasmático
ER-LAR-GECO	Addgene 61244	Amp	Proteína fluorescente roja indicadora de calcio del RE
ERMITO-Rluc	Creación propia	Amp	Luciferasa <i>Renilla</i> partida con porción N-terminal dirigida a mitocondria y C-terminal a retículo endoplasmático
ER-RFP	Addgene (55836)	Amp	Proteína fluorescente roja dirigida al retículo endoplasmático
GFP	Dr. Giles Hardingham	Kan	Proteína fluorescente verde
Globin	Dr. Giles Hardingham	Amp	Globina (usada como control de transfección cuando no se co-transfectaba con GFP)
HR1	Creación propia	Amp	Dominio HR1 de Mfn2
HR1c	Creación propia	Amp	Versión reducida del dominio HR1 de Mfn2
LC3-GFP	Dr. Antonio Zorzano	Kan	LC3 fusionada a GFP
Mfn1	Addgene (23212)	Amp	Mitofusina 1 (ratón)
Mfn1-RE	Creación propia	Amp	Mfn1 dirigida a retículo endoplasmático
Mfn1-Ras2	Creación propia	Amp	Mfn1 con el dominio RBD de Mfn2
Mfn1-TM2	Creación propia	Amp	Mfn1 con el dominio TM y C-terminal de Mfn2
Mfn1-TM2Ras2	Creación propia	Amp	Mfn1 con el dominio RBD y TM de Mfn2
Mfn2	Dr. Manuel Rojo	Amp	Mitofusina 2 (humana)
Mfn2-ΔG	Dr. Manuel Rojo	Amp	Mitofusina 2 sin dominio GTPasa
Mfn2-ΔTMΔHR2	Dr. Antonio Zorzano	Amp	Mitofusina 2 sin dominios TM y HR2
Mfn2-ΔHR1	Creación propia	Amp	Mitofusina 2 sin dominio HR1
Mfn2-HR1(1)	Creación propia	Amp	Mfn2 con el dominio HR1 de Mfn1
Mfn2-mt	Creación propia	Amp	Mfn2 dirigida a mitocondrias
Mfn2-RE	Dr. Manuel Rojo	Amp	Mfn2 dirigida a retículo endoplasmático
Mfn2-T206W	Creación propia	Amp	Mfn2 con mutación puntual en el aminoácido 206
Mfn2-TM1	Creación propia	Amp	Mfn2 con el dominio TM y C-terminal de Mfn1
mito-RFP	Dr. Antonio Zorzano	Amp	Proteína fluorescente roja dirigida a mitocondrias
RFP	Addgene 108881	Amp	Proteína fluorescente roja

17.4. Primers y vectores

En la realización de PCR de genotipado y qPCR se han utilizado los siguientes primers:

Gen	Orientación	Secuencia 5'-3'	Especie	Técnica
18S	Forward	GTG GAG CGA TTT GTC TGG TT	Ratón	qPCR
18S	Reverse	CAA GCT TAT GAC CCG CAC TT	Ratón	qPCR
Cre	Forward	GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC	Ratón	PCR (Genotipado)
Cre	Reverse	GTG AAA CAC GCA TTG CTG TCA CTT	Ratón	PCR (Genotipado)
MCU	Forward	AGA GGA GGA TCG GGG AAT CG	Ratón	qPCR
MCU	Reverse	TCT TCA CGT CGT TCA GCG TC	Ratón	qPCR

LoxP	Forward	GAA GTA GGC AGT CTC CATC G	Ratón	PCR (Genotipado)
LoxP	Reverse	CCC AAG AAG AGC ATG TGT GC	Ratón	PCR (Genotipado)
Xbp1s	Forward	GAG TCC GCA GCA GGT G	Ratón	qPCR
Xbp1s	Reverse	GTG TCA GAG TCC ATG GGA	Ratón	qPCR

Para generar las diferentes formas de mitofusinas con dominios modificados a partir de amplificaciones por PCR, se han utilizado los siguientes primers:

Nombre	Orientación	Secuencia 5'-3'
CC1F	Forward	AAA GGA TCC AAG CAG ATT GC GCG GTT CG
CC1R	Reverse	AAA GAA TTC CAT CGT AAT CTG CTT AAT TCG CAG C
CCcF	Forward	AAA GGA TCC ATG CGT GAA GAG CGG CAA GAC
CCcR	Reverse	TT TTT GAA TTC TAC TTA TAG TCT TGA GCC AAG AG
hTM2F	Forward	GC CTC CTT CAC GTG CAG GAC CTC CAT G
hTM2R	Reverse	CAG GCC GGT AAC CAT GGA AAC
MdCCF	Forward	AAA AAG CTT ACG GAG GAA GTG GAG AGG CAG G
MdCCR	Reverse	AAA AAG CTT GGC CCG GAC CGT GTG CTG C
Mfn2mtF	Forward	GGG TAG AGG GCA CAG ATG CGG ATG
Mfn2mtR	Reverse	AAA GGA TCC TGC AAG CTT GGT CCT GGA GGC CAG
mM1CCF	Forward	AAA AAG CTT CAG ATA CTA GAC ACT GTG AA
mM1CCR	Reverse	AAA AAG CTT GAC CTC CTT GAT CTT CTT CTT AAC
Myc-Mfn1	Forward	AG CAA GAA TTC ATG GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG GTG GCA GAA ACG GTA TCT CCA CTG AAG C
mMfn1-PmlI	Reverse	T TTT CAC GTG AGG GAC GCC AAT CCT GTG
Rasmut1F	Forward	CT CGG AGA CAC GTG AAG GTG GCA TTT TTT G
Rasmut1R	Reverse	ACA GCA CCT CCC CAA TGA CAG C
Rasmut2F	Forward	TT TTT GGC CGG ACG AGC AAT GGG AAG
Rasmut2R	Reverse	A AGC CAC CTT CAC GTG CCG CCT G
RevMfn1ERF	Forward	CGT CCC TCA CGA GCA GGA CCT CCA TG
RevMfn1ERR	Reverse	CCA ATC CTG TGA TCA GGG TGA TC
TMmut1F	Forward	TC CCT CAC GTG GAG AAC CTC CAT G
TMmut1R	Reverse	CGC CAA TCC TGT GAT CAG GGT G
TMmut2F	Forward	GC CTC TCT CAC GTG TAG GAC CTC CAT G
TMmut2R	Reverse	CAG GCC AGT AAC CAT GGA GAC

Y como vectores, se han utilizado los descritos a continuación:

Nombre	Origen
pEF1-V5/His	Invitrogen
pGEM-T	Promega

17.5. siRNA

Nombre	Especie	Gen	Fabricante	Referencia
ON-TARGETplus Non-targeting pool (siCT)	Ratón	Control	Dharmacon	D-001810-01-05
siGENOME Mouse Mcu siRNA-SMART pool (siMCU)	Ratón	MCU	Dharmacon	M-062849-01

17.6. Enzimas, reactivos químicos y productos varios

Nombre	Abreviatura	Fabricante	Referencia
β-mercaptoetanol		Sigma	M6250
(Z)-4-Hydrotamoxifen	Tamoxifen	Sigma	H7904
1kb DNA Ladder		Promega	G571A
2-Aminoetoxidifenil Borato	2-APB	Sigma	D9754-
2-desoxi-D-glucosa	2DG	Sigma	D8375
4-Aminopiridina	4AP	Sigma	275875
4-phenylbutiric acid	4PBA	Sigma	P21005
Aceite de maíz		Sigma	C8267
Acetona		Panreac	141007.1612
Ácido N-metil-D-aspartico	NMDA	Sigma	M3262
Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% Solution	Acrilamida	Sigma	A3574
ADN ligasa T4		Promega	M1801
Agarosa		Sigma	A2576
Agua libre de nucleasas		Promega	P119E
Albúmina de suero bovino	BSA	Sigma	A2153
Ammonium persulfate	APS	Sigma	A3678
Ampicilina	Amp	Gibco	11593
Antimicina A		Sigma	A8674
Arabinósido de citosina	AraC	Sigma	C6645
BamHI		ThermoFisher	ER0051
Bicuculina	Bic	Sigma	14340
Bromuro de etidio		Sigma	E7637
Cafeína		Sigma	C8960
Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone	CCCP	Sigma	C2759
Carestream Biomax light film		Kodac/Sigma	Z373508
CellLytic M		Sigma	C2978
Clarity Western ECL Substrate	ECL	Bio-Rad	170-5061
Dantrolene		Sigma	D9175
Dimetilsulfóxido	DMSO	Sigma	D2650
DpnI		Promega	R623A
Dodecilsulfato sódico	SDS	Sigma	L5750
EcoRI		ThermoFisher	ER0271
Estreptavidina+AlexaFluor 488		Invitrogen	S11223
Estreptavidina+Cy3		Jackson Immuno R.	016-160-084
Etanol absoluto RNAsa free		Panreac	3610861612
Eukitt Quick-hardening mounting medium	Eukitt	Sigma	D5637
Fluo-4, AM, cell permeant	Fluo-4	ThermoFisher	F14201
Glicerol		Panreac	131339
Hidrobomuro de Poli-D-Lisina	PL	Sigma	P6407
HindIII		ThermoFisher	ER0501
JM109 Competent Cells (<i>E. coli</i>)		Promega	L2001
Kanamicina	Kan	Sigma	60615
Laminina		Sigma	L2020

LB-agar		Invitrogen	22700025
LB Broth	LB	Sigma	L3022
Lipofectamine 2000		Invitrogen	11668019
Membranas de PVDF Immobilion-P		Merck	IPVH00010
Metanol		Merck	106011
NheI		ThermoFisher	ER0971
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	TEMED	Sigma	T9281
Nonidet-P 40		Fluka	74385
Oligomicina		Sigma	O4876
Papaína		Sigma	P3125
Paraformaldeído	PFA	Sigma	P6146
Pluronic F-127 (20% en DMSO)	Pluronic	ThermoFisher	P3000MP
PmlI		ThermoFisher	ER0361
Ready-Made LB Agar Powder		ThermoFisher	AAJ755851A1
ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution		Merck	2504
Rhod-2, AM, cell permeant	Rhod-2	ThermoFisher	R1245MP
Rotenona		Sigma	R8875
RNAlater Stabilization Solution	RNAlater	Invitrogen	AM7021
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder		ThermoFisher	26634
Stul		ThermoFisher	ER0421
Superfrost Plus Adhesion Microscope Slides		ThermoFisher	J1800AMNT
SuperPAP Pen		Invitrogen	8899
Tamoxifeno		Sigma	T5648-5G
Tampón carga electroforesis DNA		Promega	G190A
Tetramethylrhodamine methylester	TMRM	Sigma	T5428
Thapsigargina		Sigma	T9033
Tripsina-EDTA		Sigma	T3924
Tween 20		Sigma	P1379
VECTASHIELD Antifade Mounting Medium		Vector Laboratories	H-1200
ViviRen Live Cell Substrates	ViviREN	Promega	E6492
Xestospongin C	XeC	Abcam	ab120914
Xileno		Panreac	1417692711

17.7. Medios comerciales y suplementos

Medios comerciales:

Nombre	Abreviatura	Fabricante	Referencia
Dulbecco's Modified Eagle Medium 4,5g/l glucosa	DMEM	Gibco	1190-044
Hank's Balanced Salt Solution	HBSS	Gibco	14025-050
Minimum Essential Medium	MEM	Gibco	21090-022
Neurobasal A Medium 1x	NBA	Gibco	10888-022
OptiMEM I	OptiMEM	Gibco	31985-047

Suplementos y sales:

Nombre	Abreviatura	[Stock]	Fabricante	Referencia
Ácido quinurénico		10mM	Sigma	K3375-1G
B-27	B-27	50X	Gibco	17504-044-100ML
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	7.50%	Sigma	S8761-500ML
Cloruro de calcio	CaCl ₂	1M	Sigma	21098
Cloruro de magnesio	MgCl ₂	2M	Sigma	M8266
Cloruro de potasio	KCl	3M	Panreac	131494
Cloruro de sodio	NaCl	5M	Sigma	C8267
Glicina		1M	Applichem	A3707
Glucosa		2,5M (45%)	Sigma	G8769
HEPES		1M	Lonza	BE13-737
Hidróxido de sodio	NaOH	1M	Sigma	221465
Insulina-Transferrina-Selenio	ITS	100X	Gibco	51500-056
L-Cisteína		-	Sigma	C7352
L-Glutamina	L-Gln	200mM	Lonza	17905C
Penicilina/Estreptomina	P/E	10.000U/ml (10.000µl/ml)	Lonza	DE17602F
Piruvato sódico	Pyr	100mM	Lonza	BE13-115
Rojo Fenol		0.50%	Sigma	P0290
Suero Fetal Bovino	FBS	100%	Lab Clinic	A15-101
Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	0,25M	Sigma	P0772
Sulfato de sodio	Na ₂ SO ₄	1M	Sigma	239313

17.8. Soluciones

Nombre	Abreviatura	Composición
SDS 10%		10g SDS por cada 100ml de agua milliQ
Solución de bloqueo con BSA		PSB1X, BSA 3%
Solución de bloqueo con leche		PSB1X, leche desnatada en polvo 5%
Tampón de carga Laemmlí 1.5X		En Tris 1,5M pH6,8; glicerol 15%, SDS 3%, β-mercaptoetanol 7,5% y azul de bromofenol 0,0375%
Tampón de electroforesis 10X	SDS-PAGE	Para 2L: Añadir en agua milliQ 288,26g glicina, 60,56g Tris Base y 20g SDS.
Tampón de fijación PFA 4%	PFA 4%	Para 1L: 250ml PFA 16% y 750ml PB 0,1M pH 7,2
Tampón de lavado Western Blot	PSB-Tween	PSB 1X, Tween20 0,5%
Tampón de transferencia 10X		Para 2L: Añadir en agua milliQ 60,56g Tris, 288,26g glicina
Tampón fosfato (1M)	PB	K ₂ HPO ₄ 1M, NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O 1M
Tampón fosfato salino	PBS	Para 1L: 80g NaCl, 2g KCl, 2g K ₂ HPO ₄ , 11,8g Na ₂ HPO ₄ (ajustar pH7,4)
Tampón fosfato Sorénson		0,1M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH7,2
Tampón Tris-Acetato-EDTA 50X	TAE	Para 1L: 242g Tris, 57,1ml ácido acético glacial y 93,06g EDTA

17.9. Kits

Nombre	Proveedor	Referencia
ATPlite Luminescence Assay System	Perkin Elmer	6016943
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	4337454
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega	E2920
FD Rapid GolgiStain	FD NeuroTechnologies	PK401A
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma	PLN70
GoTaq G2 Green Master-Mix	Promega	M7822
GoTaq qPCR Master Mix	Promega	A6002
HisPeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12663
HisPeed Plasmid Midi Kit	Qiagen	12643

MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay	Agilent	MX-200-4
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific	23227
PureLink RNA Mini Kit	Invitrogen	12183025
Q5 [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs	E0552S
Superscript III First-Strand Synthesis Super Mix	Invitrogen	11752-50
Wizard [®] SV Gel and Clean-Up System	Promega	A9282

17.10. Equipos

Nombre	Proveedor
Agitador termoregulable	Eppendorf
Cabinas Bio-II-A	Telstar
Cámara Leica DFC550	Leica
Cámara Olympus DP70	Olympus
Citometro de flujo SORTER FUSION	BD Biosciences
Criostato Leica CM1900	Leica
Depurador de agua milliQ	Merck
Equipo electroforesis horizontal	Bio-Rad
Incubadora Galaxy 170S	Eppendorf
Lector de placas Infinite M200PRO	Tecan
Lupa binocular StereoBlue	Euromex
Microcentrífuga refrigerada	Eppendorf
Microscopio confocal Zeiss LSM 880	Zeiss
Microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010	Jeol
Microscopio de fluorescencia Olympus BX61	Olympus
Microscopia de fluorescencia invertido Leica DM IRB	Leica
Microscopio óptico Axiovert 40C	Zeiss
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
Placa NanoQuant	Tecan
Termociclador PCR	Eppendorf
Termociclador qPCR StepOnePlus	Applied biosystems
Transiluminador UV	UVP
Ultracentrífuga refrigerada Jouan CR4.12	Thermo Fisher Scientific
Ultracentrífuga refrigerada Sorvall RC 5C Plus	Marshall Scientific

17.11. Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona

Servicio	Localización	Especificaciones técnicas
Citometría	Parc Cientific Barcelona	Todas las aproximaciones realizadas mediante este servicio han sido realizadas personalmente
Estabulario de ratas	Facultad Farmacia	El mantenimiento y cruces de los animales ha sido realizado por el personal técnico

Estabulario de ratones	Facultad Farmacia	El mantenimiento de los animales ha sido realizado por el personal técnico, mientras que los cruces y las manipulaciones se han realizado personalmente
Genómica	Parc Científic Barcelona	Las muestras a analizar han sido enviadas al servicio, donde han sido procesadas por el personal técnico
Microscopia electrónica	Parc Científic Barcelona	El procesamiento de las muestras ha sido realizado por el personal técnico
Microscopia óptica avanzada	Facultad Biología	Todas las aproximaciones realizadas mediante este servicio han sido realizadas personalmente

18. Análisis estadísticos

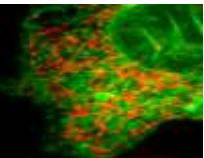
Todos los experimentos mostrados en el trabajo han sido analizados mediante métodos estadísticos realizando en cada uno de ellos un mínimo de 3 réplicas independientes ($n \geq 3$). Todos los datos se presentan con la media y el error estándar de la misma ($\pm SEM$).

La comparación entre medias de dos grupos se ha llevado a cabo mediante la prueba *t* de Student de dos colas para muestras independientes. Las comparaciones múltiples (entre más de dos grupos) se han llevado a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por el test *post-hoc* de Tukey.

En todos los análisis estadísticos utilizados se realizan las siguientes suposiciones como condición previa a su uso:

- Los grupos comparados siguen una distribución normal.
- Los grupos comparados poseen homogeneidad de varianzas.
- Los datos usados son muestreados independientemente para cada uno de los grupos comparados.

OBJETIVOS

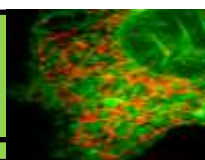


El objetivo principal de este trabajo es determinar el papel de Mfn2 en la regulación de la bioenergética mitocondrial y conocer su implicación en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas neuronales.

Para ello, se establecieron los siguientes puntos a tratar:

1. Estudiar los distintos procesos en los cuales Mfn2 está implicada y su repercusión en la bioenergética mitocondrial.
2. Analizar las interacciones entre mitofusinas y su contribución en la regulación de la bioenergética mitocondrial.
3. Determinar cómo la regulación de la bioenergética mitocondrial a través de Mfn2 afecta al desarrollo neuronal.
4. Estudiar el carácter neuroprotector de Mfn2 durante eventos excitotóxicos.

RESULTADOS



1. Estudio del mecanismo de regulación de la bioenergética mitocondrial a través de Mfn2

Este primer gran bloque de resultados está realizado íntegramente en distintas líneas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) como modelo experimental, las cuales son deficientes en Mfn1 (Mfn1KO), en Mfn2 (Mfn2KO) o *wild-type* (WT). Mediante la comparación entre estas líneas celulares se pretende dilucidar el mecanismo a través del cual Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial.

1.1. La falta de Mfn2, pero no de Mfn1, causa alteraciones en la bioenergética mitocondrial de manera independiente a su morfología

La pérdida de Mfn1 causa mayor impacto en la morfología mitocondrial que la pérdida de Mfn2

Las mitofusinas 1 y 2 fueron descritas originalmente como proteínas encargadas de la dinámica mitocondrial, más concretamente del proceso de fusión (Santel & Fuller 2001; Rojo et al. 2002; Bach et al. 2003). En nuestro modelo experimental, frente a la falta de Mfn1 o Mfn2, en las líneas Mfn1KO y Mfn2KO (Fig.20A) se observó una clara alteración en la morfología mitocondrial (Fig.20B). Para analizarlo de manera exhaustiva se procedió a la medida de tres parámetros distintos que tienen en cuenta diferentes características morfológicas mitocondriales tanto a nivel general de la célula como individual de las propias mitocondrias. En primer lugar se determinó el porcentaje de células que poseen mitocondrias con aspecto globular (Fig.20C), típicas de un estado de mayor fisión mitocondrial, frente a las mitocondrias tubulares, típicas de un estado de mayor fusión mitocondrial. En segundo lugar, se determinó el “*Aspect Ratio*” (Fig.20D), uno de los parámetros más comúnmente usados para determinar la morfología mitocondrial (Koopman et al. 2006) y que tiene en cuenta la relación entre el eje mayor y el eje menor de la mitocondria, siendo mayor el valor obtenido cuanto más alargada sea. Por último, se determinó la circularidad (Fig.20E), otro de los parámetros más comúnmente usados (Wiemerslage & Lee 2016), el cual se define en función del área y el perímetro mitocondriales, dando un valor de 0 a 1 y siendo 1 la máxima circularidad. En todos estos parámetros se observó como la deficiencia tanto

de Mfn1 como de Mfn2 causa un estado de mayor fisión mitocondrial, teniendo la pérdida de Mfn1 un mayor impacto que la de Mfn2, tal y como está descrito desde hace años en modelos *knockout* para ambas proteínas (Chen et al. 2003).

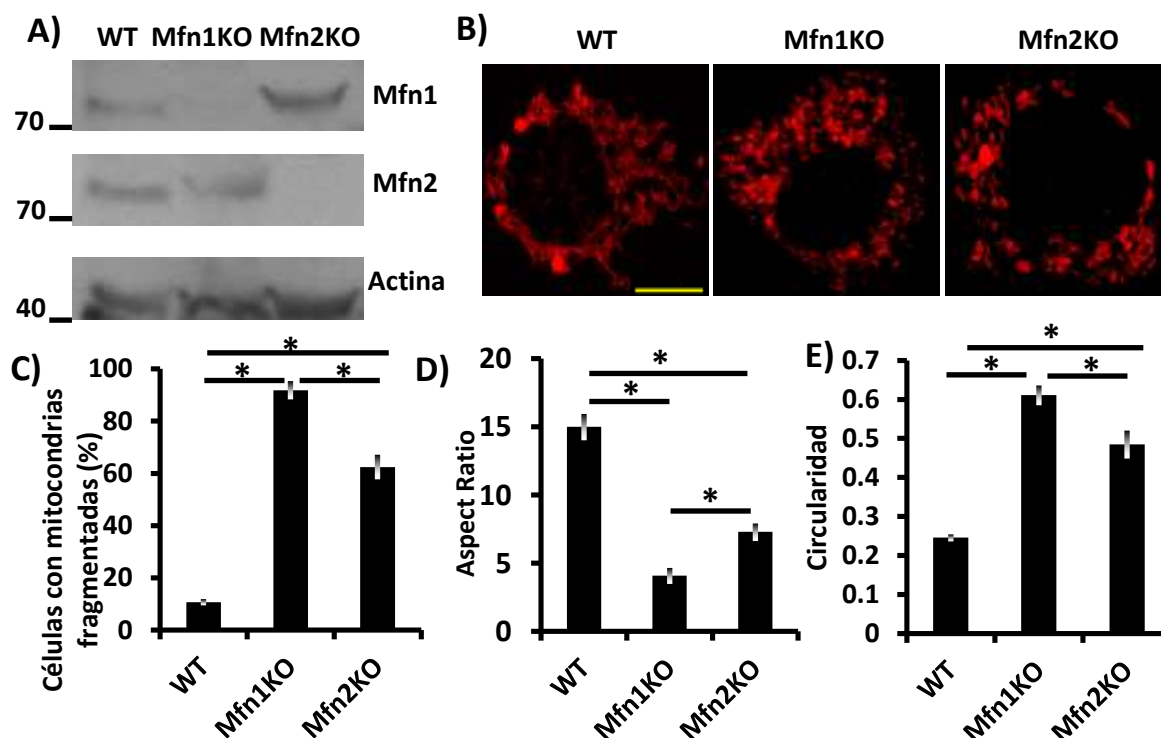


Figura 20: A) *Western Blots* representativos de las proteínas indicadas en las líneas de MEF WT, Mfn1KO y Mfn2KO. B) Imágenes representativas de células WT, Mfn1KO y Mfn2KO transfectadas 48h con mito-RFP. Barra de escala: 5µm. C) Porcentaje de células con mitocondrias globulares (n=310-668 células analizadas en 3-6 experimentos independientes). D) Análisis del *Aspect Ratio* calculado como eje mayor/eje menor y (E) circularidad calculada como $4 \cdot \pi \cdot \text{Area} / \text{Perímetro}^2$ (n=300 mitocondrias en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

La falta de Mfn2 afecta negativamente a la bioenergética mitocondrial

Por su parte, Mfn2 es un potente regulador de la bioenergética mitocondrial (Bach et al. 2003; Pich et al. 2005; Chen et al. 2005; Mourier et al. 2015), pero el mecanismo por el cual esta proteína realiza esta función todavía no se entiende del todo. Por ese motivo, se decidió analizar tres parámetros clásicos que definen la bioenergética mitocondrial, como son el potencial de membrana mitocondrial (MMP), la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la producción de ATP.

Al comparar las líneas deficientes en Mfn1 o Mfn2 con la WT, se observó que solo la línea Mfn2KO mostraba un MMP reducido (Fig.21A), ya que ésta presentaba una

menor señal de fluorescencia de la sonda TMRM, la cual es captada hacia la mitocondria de manera dependiente del MMP.

El análisis de consumo de O₂ se realizó mediante la sonda fluorescente MitoXpress Xtra, en la cual el O₂ actúa como *quencher* o “silenciador”, por lo que a medida que se va consumiendo el oxígeno la sonda va emitiendo más fluorescencia. Mediante el tratamiento con distintos inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, se puede obtener directamente un perfil *in vivo* de cuatro parámetros esenciales que definen la OCR. Éstos son la respiración basal, la fuga de H⁺ (respiración no destinada a la producción de ATP), la respiración máxima y la respiración no mitocondrial. Tras realizar esta aproximación también se confirmó que la línea Mfn2KO presenta una disminución tanto en OCR basal como en máximo, aunque no presenta diferencias en la fuga de H⁺ ni en la respiración no mitocondrial (Fig.21B). A partir de los valores obtenidos en el perfil de OCR se pueden calcular otros parámetros derivados e igualmente interesantes para determinar la bioenergética mitocondrial. Estos son la respiración acoplada a ATP (respiración basal que se destina a la producción de ATP), la eficiencia acopladora (eficiencia en la producción de ATP respecto su respiración basal), el *respiratory control ratio (RCR)* (capacidad de oxidar un sustrato para generar ATP sin pérdida de H⁺) y la *Spare respiratory capacity (SCR)* (capacidad de respirar a su máximo potencial, lo cual da una idea de la capacidad de la célula para responder frente a demandas energéticas). En estos parámetros de nuevo se observó una disminución únicamente en la línea Mfn2KO (Fig.21C). Este ensayo se quiso ratificar mediante el uso de un modelo automatizado, muy extensamente utilizado y validado en la determinación del OCR, como es el *Seahorse XF* (Yépez et al. 2018; Muller et al. 2019; Underwood et al. 2020), el cual se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Francesc Villaroya (Universidad de Barcelona). Utilizando este modelo automatizado se obtuvo un perfil muy similar al obtenido con la sonda, en el cual hay una disminución en la respiración basal y máxima en las células Mfn2KO (Fig.21D).

Los resultados de OCR indicaron que la respiración mitocondrial estaba comprometida en células Mfn2KO, así que se analizó si también existían cambios en los niveles de ATP. No obstante, no se observaron diferencias entre WT, Mfn2KO y Mfn1KO en los niveles de ATP total (Fig.21E). Dado que las células ajustan sus vías metabólicas para

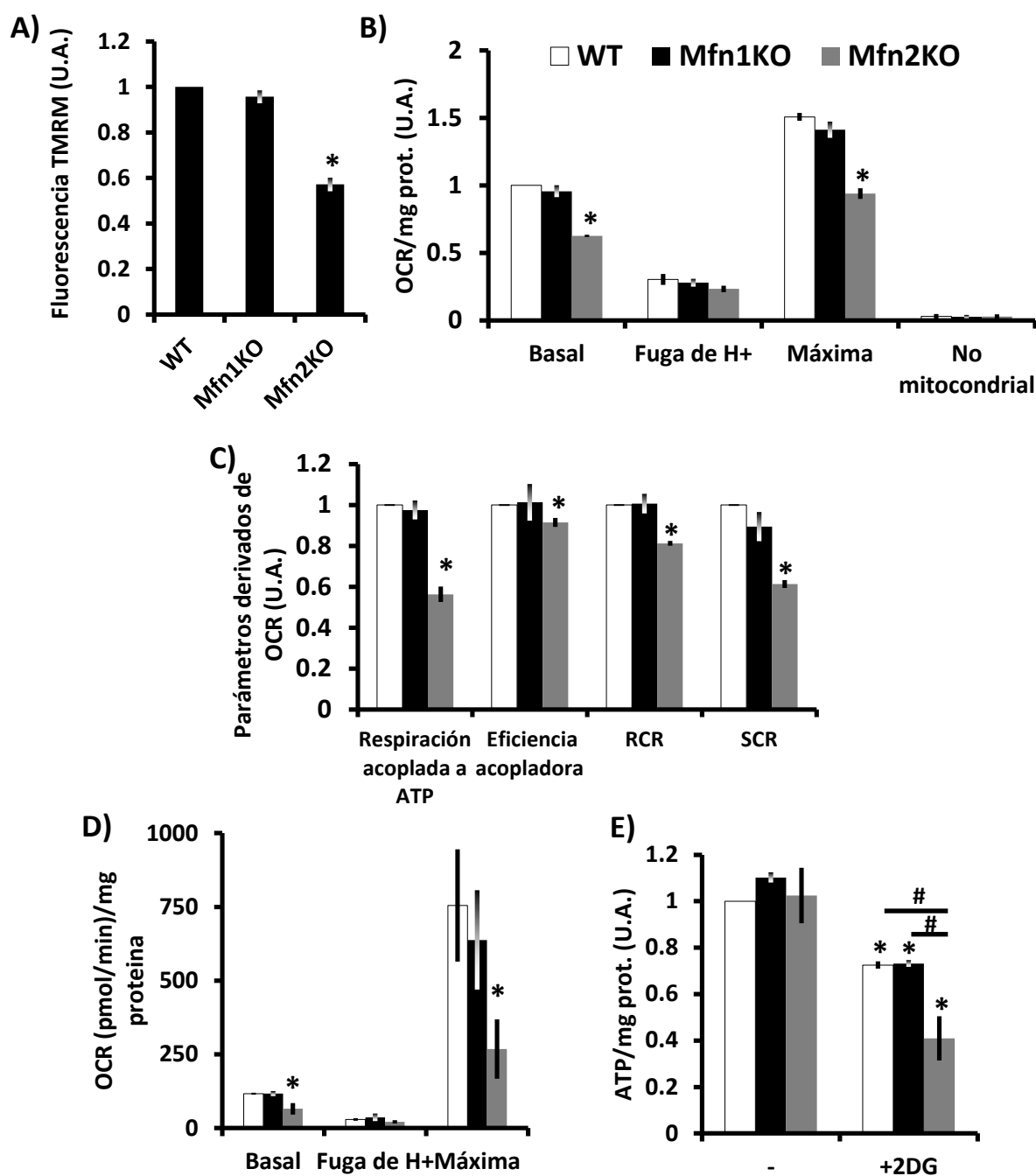


Figura 21: A) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) (n=90 células en 3 experimentos independientes). B) El OCR fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra. Para obtener las diferentes medidas se aplicó oligomicina (1 μ M), CCCP (10 μ M), rotenona 1 (μ M) y antimicina A (1 μ M) tal como se describe en el apartado de materiales y métodos (n=3 experimentos independientes). C) Los parámetros derivados del OCR se calcularon de la manera descrita en el apartado de materiales y métodos. D) El consumo de oxígeno fue medido mediante el sistema Seahorse XF y normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra (n=3 experimentos independientes). E) Las células WT, Mfn1KO y Mfn2KO fueron incubadas durante 6h con solvente o 2DG (10mM) y entonces se midieron los niveles de ATP (n= 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. #p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05 respecto a su control.

intentar mantener unos niveles constantes de ATP total (Smith et al. 2018), se inhibió la glicólisis mediante el uso de 2-desoxi-D-glucosa (2DG), análogo de la glucosa que bloquea la ruta (Pajak et al. 2020). En este caso, se observó que el ATP producido exclusivamente por fosforilación oxidativa en las mitocondrias también era menor en la línea Mfn2KO (Fig.21E).

La recuperación de la morfología mitocondrial no rescata su déficit energético

Generalmente una morfología mitocondrial tubular se asocia a un buen estado bioenergético mitocondrial (Liesa & Shirihai 2013). No obstante, en nuestro modelo, la línea Mfn1KO pese a tener mayores alteraciones en la morfología mitocondrial que la línea Mfn2KO, no muestra deficiencias a nivel bioenergético. Frente a estos resultados se decidió comprobar si recuperando la morfología mitocondrial tubular en la línea Mfn2KO, las mitocondrias recuperaban su estado bioenergético normal. Para ello, se realizaron dos aproximaciones distintas, en la primera se sobreexpresó Mfn1 y en la segunda se inhibió la función de Drp1, proteína que dirige la fisión mitocondrial, mediante la expresión de un dominante negativo de dicha proteína (DN-Drp1) (Fig.22A). En ambas aproximaciones se confirmó que se recuperaba la morfología tubular ya que había un menor porcentaje de células con mitocondrias globulares (Fig.22B, C), las mitocondrias tenían un aspecto más alargado (Fig.22D) y eran menos circulares (Fig.22E). No obstante, tanto el MMP (Fig.22F) como el OCR basal (Fig.22G) no se vieron alterados frente a la sobreexpresión de Mfn1 o DN-Drp1, por lo que el estado bioenergético mitocondrial continuaba comprometido pese a restituir la morfología mitocondrial.

Estos resultados indican que la regulación de la bioenergética mitocondrial a través de Mfn2 es independiente a la morfología mitocondrial.

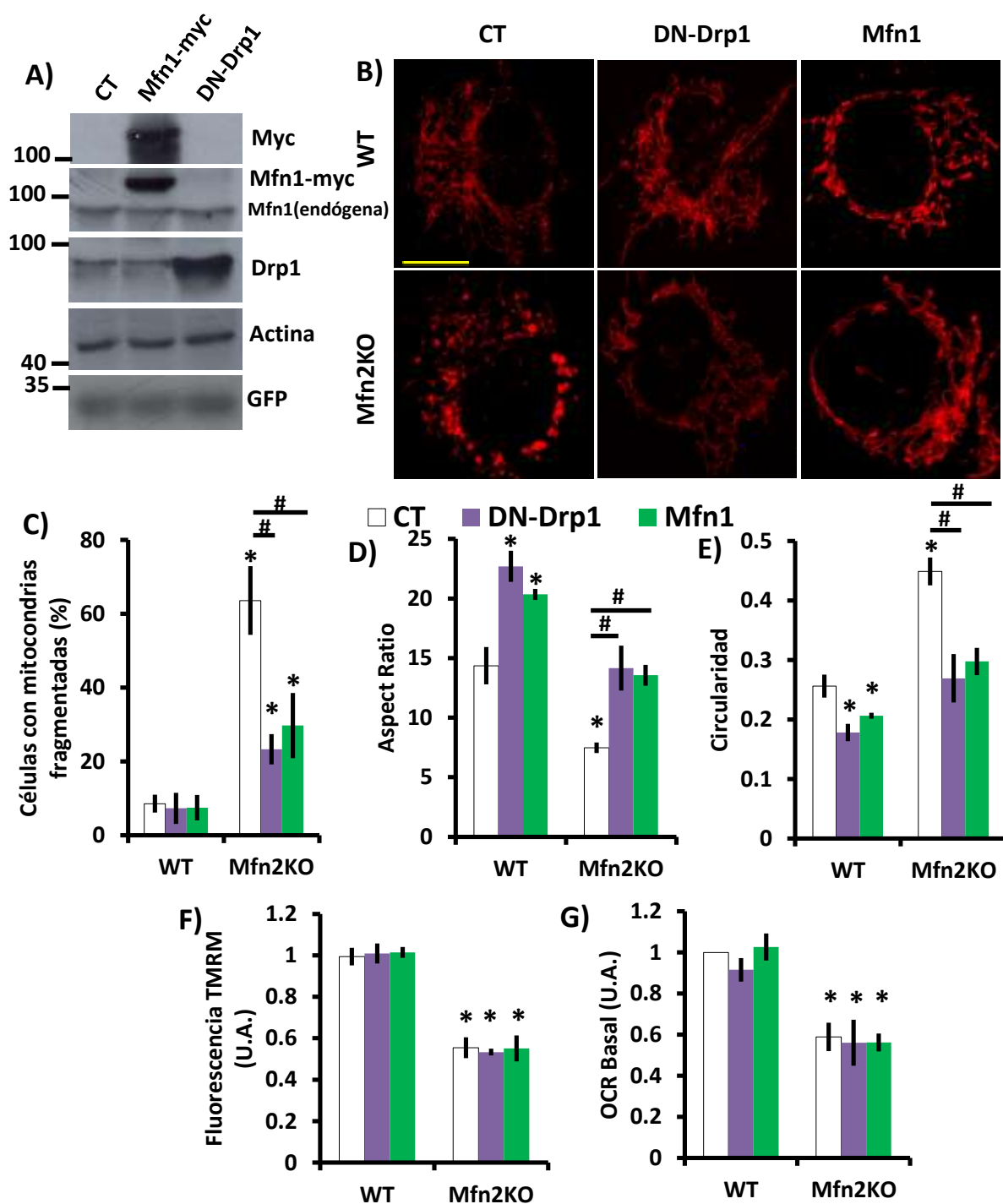


Figura 22: A) *Western Blots* representativas de las proteínas indicadas en fibroblastos Mfn2KO transfectados con plásmidos que expresaban Mfn1, DN-Drp1 o un plásmido control (n=3 experimentos independientes). B) Imágenes representativas de células WT y Mfn2KO co-transfectadas 48h con mito-RFP y Mfn1 o DN-Drp1. Barra de escala: 5µm. C) Porcentaje de células con mitocondrias globulares (n=135-470 células analizadas en 3 experimentos independientes). D) Análisis del *Aspect Ratio* calculado como eje mayor/eje menor y (E) circularidad calculada como $4 \cdot \pi \cdot \text{Area} / \text{Perímetro}^2$ (n=300 mitocondrias en 3 experimentos independientes). F) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) (n=90 células en 3 experimentos independientes). G) El OCR basal fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra (n=3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. #p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05 respecto a su control.

1.2. El estrés del RE y la mitofagia no son los mecanismos por los cuales Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial

La falta de Mfn2 causa la activación de la UPR

Otro de los procesos celulares en los cuales se ha visto que Mfn2 está implicada es la respuesta al estrés del RE (UPR) (Sebastián et al. 2012; Ngho et al. 2012; Muñoz et al. 2013). El estrés del RE es uno de los mecanismos que regulan la bioenergética mitocondrial (Bravo et al. 2011; Balsa et al. 2019; Carreras-Sureda et al. 2019). Por lo tanto, para determinar si este es el mecanismo por el cual Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial, se analizó la activación de las tres vías de activación de la UPR en células Mfn2KO. En la vía analizada iniciada por el sensor PERK, se comprobó indirectamente su activación mediante el análisis por *Western Blot* de los niveles de

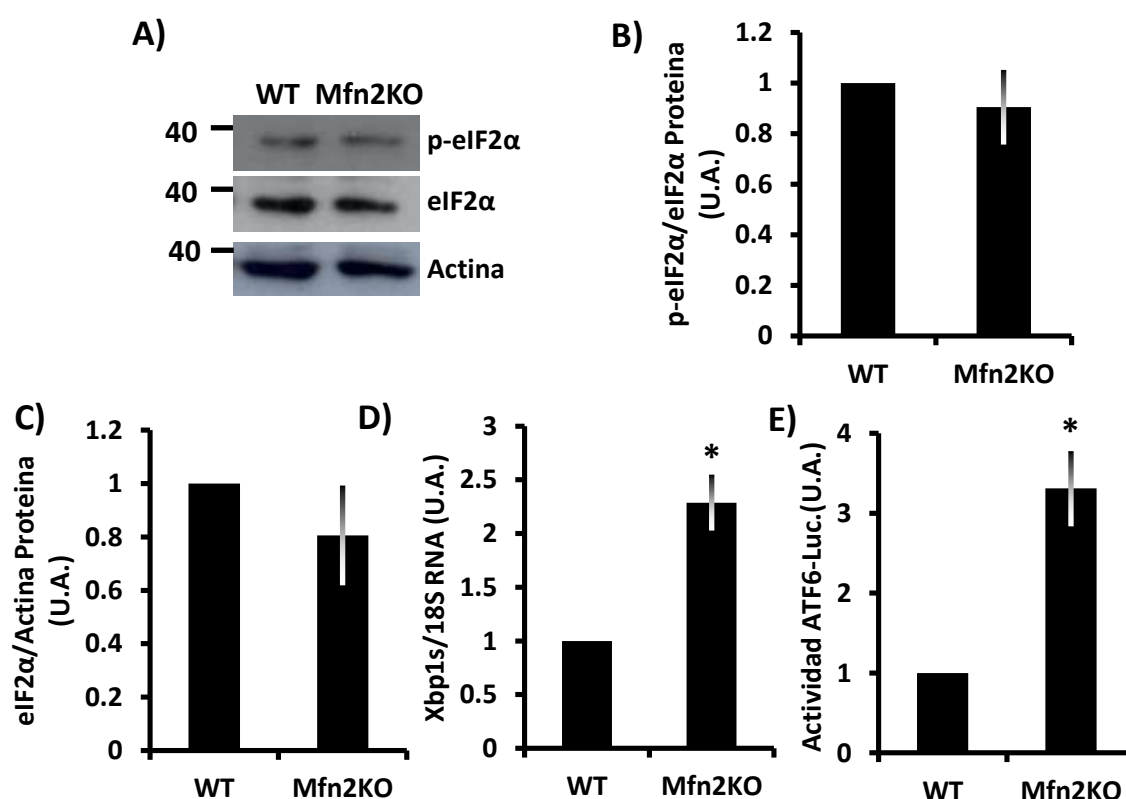
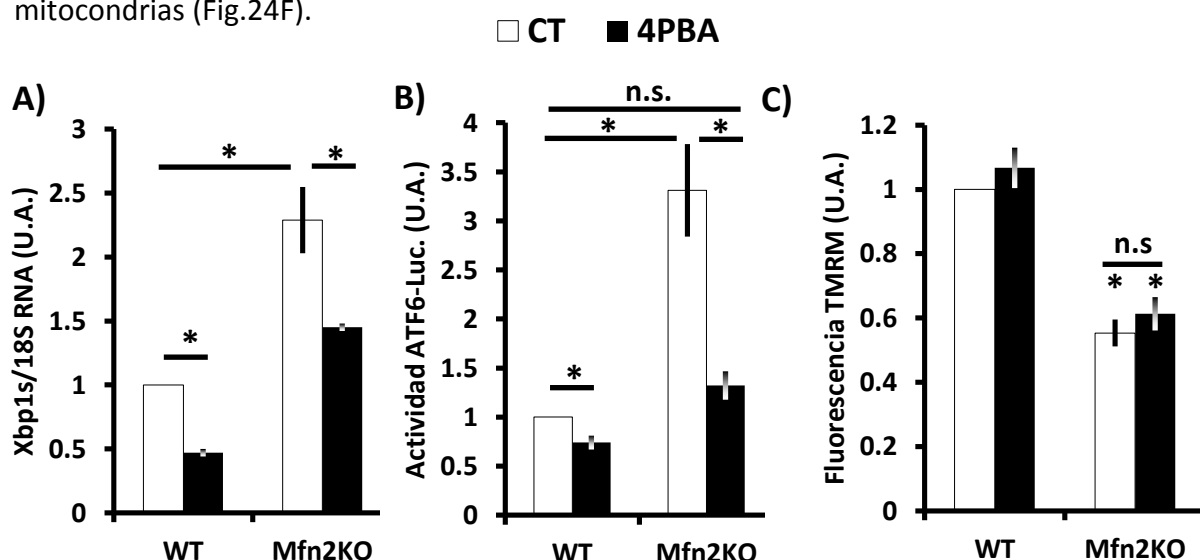


Figura 23: A-C) *Western Blots* representativos y análisis densitométricos de las proteínas indicadas en MEFs WT y Mfn2KO (n=4 experimentos independientes). D) Los niveles de RNAm de Xbp1s fueron analizados por qPCR en MEFs WT y Mfn2KO (n=3 experimentos independientes). E) Actividad de luciferasa bajo el promotor de ATF6 en MEFs WT y Mfn2KO (n=3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, prueba t de Student.

fosforilación de su proteína diana eIF2 α , pero no se observaron diferencias respecto a las WT (Fig.23A-C). En la vía iniciada por el sensor IRE1, se analizó mediante qPCR la expresión génica de la forma de *splicing* de Xbp1 generada en la UPR, Xbp1s. En este caso sí que se observó un aumento respecto a la línea WT (Fig.23D), por lo que esta vía se encuentra más activa. Los resultados anteriores fueron realizados en nuestro grupo de investigación por la Dra. Raquel Larramona y Paula Tena, respectivamente. Por último, en la vía iniciada por el sensor ATF6, se midió la actividad transcripcional del factor de transcripción ATF6 en las células Mfn2KO y también se observó un aumento en la misma respecto a las WT (Fig.23E).

El alivio del estrés del RE no mejora la bioenergética mitocondrial

Para comprobar si el estrés del RE es el mecanismo mediante el cual Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial, se procedió a usar la chaperona química *4-phenylbutyric acid* (4PBA), la cual alivia el estrés del RE (de Almeida et al. 2007; Kawasaki et al. 2012). Efectivamente, en nuestras células Mfn2KO también permitió el alivio del estrés del RE a los niveles de las células WT, tal y como se observó en la disminución de la expresión de Xbp1s (Fig.24A) y la actividad transcripcional de ATF6 (Fig.24B). Pese a ello, el uso de 4PBA no tuvo ningún efecto en la bioenergética mitocondrial, ya que no consiguió reestablecer los niveles del MMP (Fig.24C), OCR (Fig.24D, E) ni ATP producido en las mitocondrias (Fig.24F).



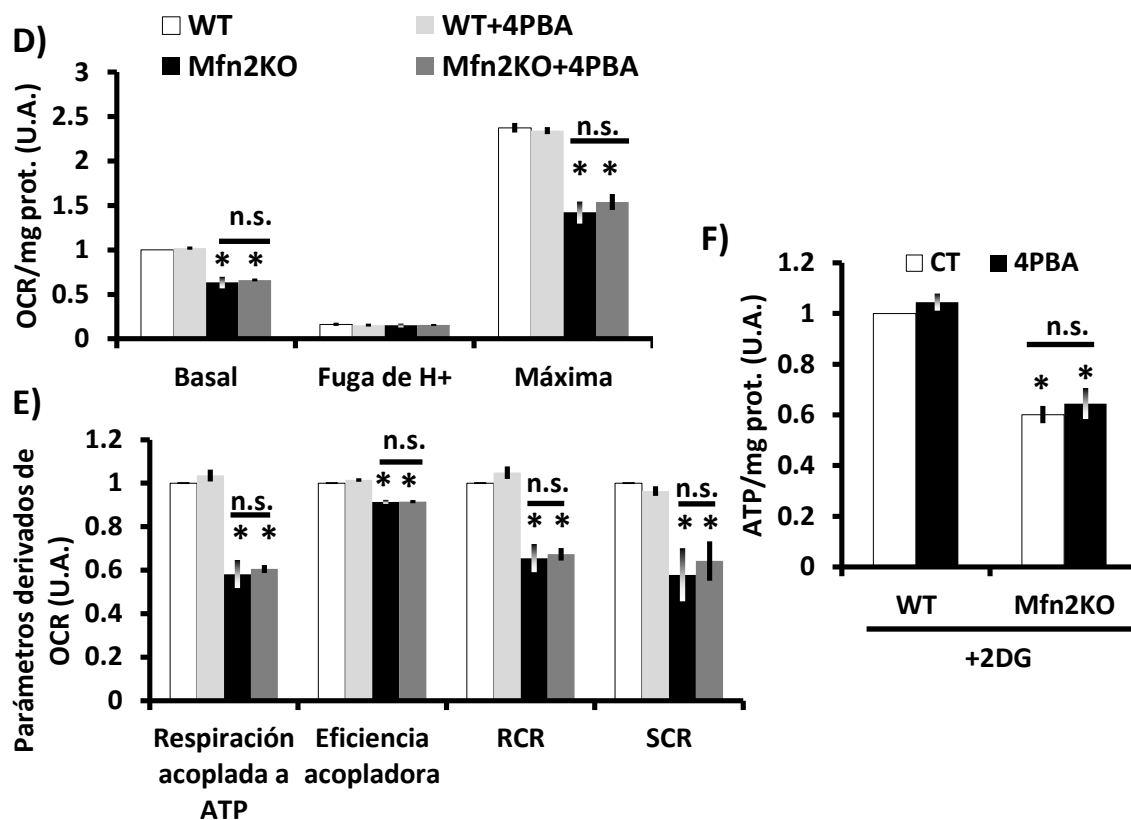


Figura 24: A) Los niveles de RNAm de Xbp1s fueron analizados por qPCR en MEFs WT y Mfn2KO tratados con solvente o 4PBA (10mM) durante 24h (n=3 experimentos independientes). B) Actividad de luciferasa bajo el promotor de ATF6 en MEFs WT y Mfn2KO tratados con solvente o 4PBA (10mM) durante 24h (n=3 experimentos independientes). Nótese que los controles de estos experimentos y las Fig.23D, E son los mismos valores, ya que se realizaron a la vez, pero se han dividido las figuras por el bien de la linealidad del estudio. C) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) (n=90 células en 3 experimentos independientes). D) El OCR fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra. Para obtener las diferentes medidas se aplicó oligomicina (1µM) y CCCP (10µM) tal como se describe en el apartado de materiales y métodos (n=3 experimentos independientes). E) Los parámetros derivados del OCR se calcularon de la manera descrita en el apartado de materiales y métodos. F) Las células fueron incubadas durante 6h con 2DG (10mM) y entonces se midieron los niveles de ATP (n= 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey (n.s.=no significativo).

La deficiencia de Mfn2 no altera la mitofagia

Por otro lado, Mfn2 también modula la mitofagia a través del mecanismo dependiente de ubiquitinización donde están involucradas las proteínas PINK1-Parkin (Chen & Dorn 2013; Gong et al. 2015). Dado que en el sistema de control de calidad mitocondrial los procesos de mitofagia y bioenergética mitocondrial están fuertemente relacionados (Pickles et al. 2018), se pensó en esta vía como potencial reguladora de la

bioenergética mitocondrial a través de Mfn2. De hecho, Mfn1 y Mfn2 son ubiquitinizadas por Parkin y posteriormente degradadas durante el proceso de mitofagia (Tanaka et al. 2010). No obstante, no se observaron cambios en los niveles de Mfn1 al analizarlos mediante *Western Blot* (Fig.25A, B). El equilibrio entre biogénesis mitocondrial y mitofagia garantiza el mantenimiento de la red mitocondrial, por lo que alteraciones en la mitofagia se traducen en cambios en la masa mitocondrial (Pickles et al. 2018). Por este motivo se analizaron los niveles de expresión de las

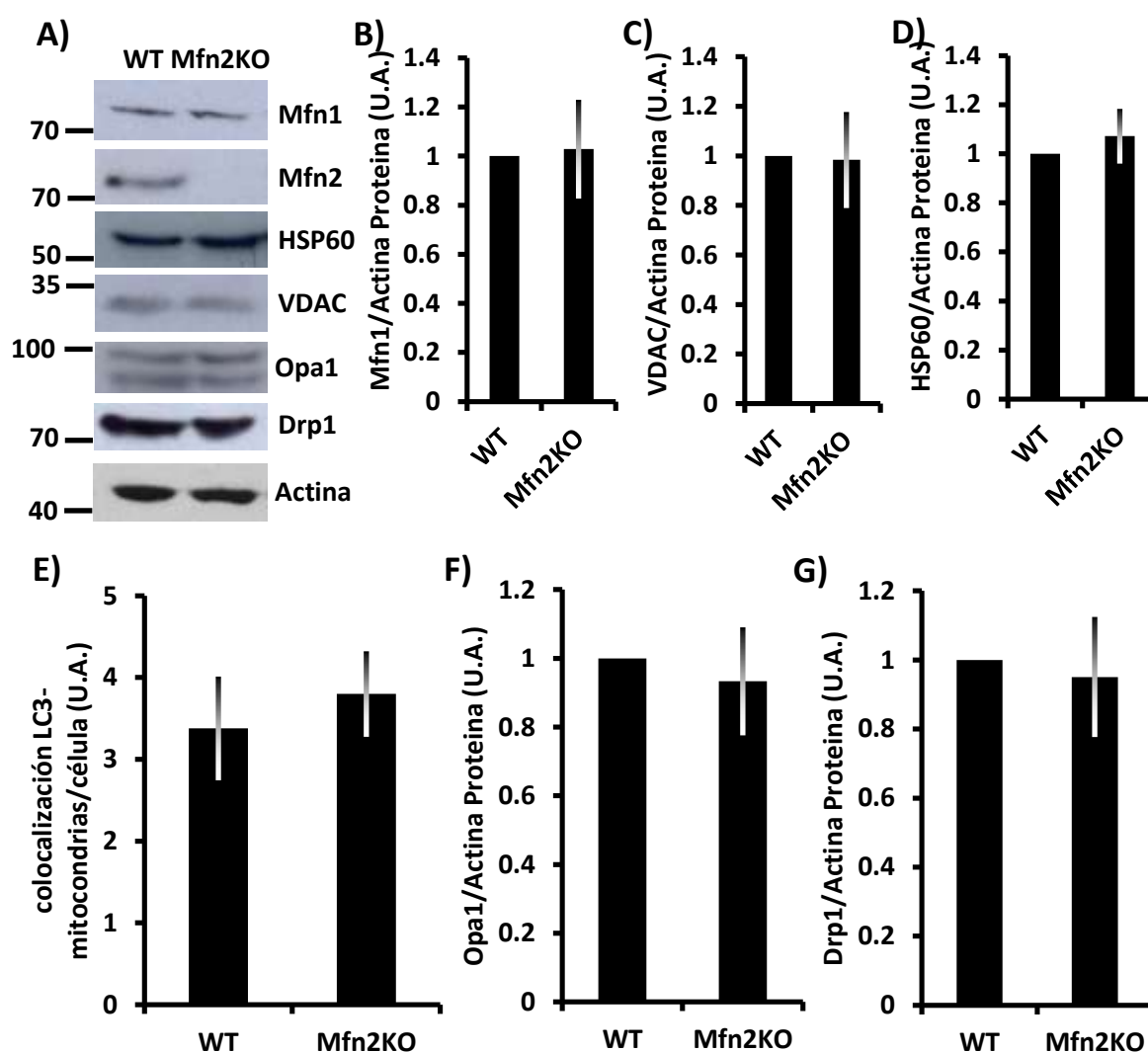


Figura 25: A-D, F-G) *Western Blots* representativos y análisis densitométricos de las proteínas indicadas en MEFs WT y Mfn2KO (n=3 experimentos independientes). E) Las células WT y Mfn2KO fueron transfectadas con un plásmido que codificaba para LC3-GFP, después de 48h fueron fijadas y se contó el número de mitocondrias que colocalizaban con LC3 por célula (n=118 células analizadas en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, prueba t de Student.

proteínas mitocondriales VDAC y HSP60, típicamente usadas como marcadores de masa mitocondrial, y de nuevo, no se observaron cambios respecto a la línea WT (Fig.25A, C-D). Finalmente, se analizó la co-localización de LC3 con las mitocondrias, pero tampoco se observaron cambios entre la línea WT y Mfn2KO (Fig.25E). Pese a que la dinámica mitocondrial y la mitofagia también están altamente relacionadas (Pickles et al. 2018), mediante *Western Blot* no se observaron cambios en las otras dos proteínas de la maquinaria mitocondrial de fusión/fisión, a parte de las mitofusinas, como son Opa1 y Drp1.

Por lo tanto, estos resultados determinaron que ni estrés del RE ni mitofagia parecen ser los mecanismos implicados en la regulación de la bioenergética mitocondrial mediada por Mfn2.

1.3. La falta de Mfn2, pero no de Mfn1, produce alteraciones en las MAMs y en el transporte de Ca^{2+} entre RE y mitocondrias

La falta de Mfn2 afecta negativamente la distancia entre MAMs

Desde hace ya muchos años se ha descrito que el Ca^{2+} liberado por el RE es captado por las mitocondrias en regiones de contactos muy próximos entre ambos orgánulos (Rizzuto et al. 1998), concretamente a través del canal MCU (De Stefani et al. 2011; Baughman et al. 2011). Esta captación de Ca^{2+} es esencial para mantener la bioenergética mitocondrial (Cárdenas et al. 2010; Anelli et al. 2012; Carreras-Sureda et al. 2017a; Marchi et al. 2018). Además de las funciones anteriores, a Mfn2 se le atribuyen funciones fundamentales en las MAMs, y es que una pequeña fracción de Mfn2 localiza en el RE donde interacciona con las mitofusinas mitocondriales (de Brito & Scorrano 2008). No obstante, existen discrepancias sobre el papel que realiza Mfn2 exactamente, si actuando como enlazadora (de Brito & Scorrano 2008; Hailey et al. 2010; Area-Gomez et al. 2012; Sugiura et al. 2013; Naon et al. 2016; Basso et al. 2018) o separadora (Cosson et al. 2012; Filadi et al. 2015; Leal et al. 2016). Por este motivo, se decidió comprobar si en el modelo experimental utilizado Mfn2 actuaba como enlazadora o separadora. Para obtener mayor robustez y validez en nuestros resultados, se usaron tres aproximaciones distintas. La primera es la medida del coeficiente de Manders, el cual cuantifica el grado de colocación entre dos

fluoróforos mediante microscopia confocal, en base al solapamiento de su señal. Para ello, las distintas líneas celulares se co-transfectaron con RFP dirigido a las mitocondrias y GFP dirigido al RE. Mediante esta técnica, se pudo comprobar que en las células Mfn2KO, pero no en las Mfn1KO, había una menor colocalización entre mitocondria y RE que en las WT (Fig.26A, B). Parece improbable que los resultados observados se deban a las diferencias en la morfología mitocondrial, ya que las mitocondrias de las células Mfn1KO son incluso más globulares (Fig.20B-E) pero no presentaban cambios en el coeficiente de Manders. Pese a ello, para confirmarlo, se sobreexpresó DN-Drp1 para reestablecer de nuevo la morfología mitocondrial en las células Mfn2KO (Fig.22B-E) y el coeficiente de Manders no se vio alterado (Fig.26C).

Para la segunda aproximación, se diseñó una luciferasa *Renilla* partida (ERMITO-RLuc), la cual contiene dos partes auto-ensamblables de manera reversible separadas por un péptido P2A de auto-corte (Fig.26D). Una de las partes contiene un péptido de localización a mitocondrias y la otra al RE, y cuando se encuentran a suficiente proximidad, la enzima se reconstituye y se activa funcionalmente. Además, contiene una secuencia espaciadora que permite el ensamblaje de ambas partes cuando RE y mitocondrias se encuentran entre 12 y 23,5 nm, es decir, el rango óptimo de separación entre ambos orgánulos para el intercambio de Ca^{2+} (Giacomello & Pellegrini 2016).

La activación de mTORC2 promueve la formación de MAMs (Betz et al. 2013), así que la Dra. Raquel Larramona, integrante del grupo de investigación, manipuló la vía de mTOR para validar la capacidad de ERMITO-RLuc de detectar cambios en los contactos RE-mitocondria. Por un lado, tras inhibir mTOR mediante el uso de PP242 (Xing et al. 2014) se observó una disminución en la actividad RLuc (Fig.26E), mientras que tras activar mTOR mediante el uso de MHY1485 (Choi et al. 2012), se observó un aumento en la misma (Fig.26F). Por lo tanto, se pudo confirmar que el sistema ERMITO-RLuc era sensible a cambios en los contactos RE-mitocondrias. Así pues, se analizaron los contactos mediante este ensayo en las líneas WT, Mfn1KO y Mfn2KO, y de nuevo solo las células Mfn2KO presentaban una disminución en los mismos (Fig.26G). Para

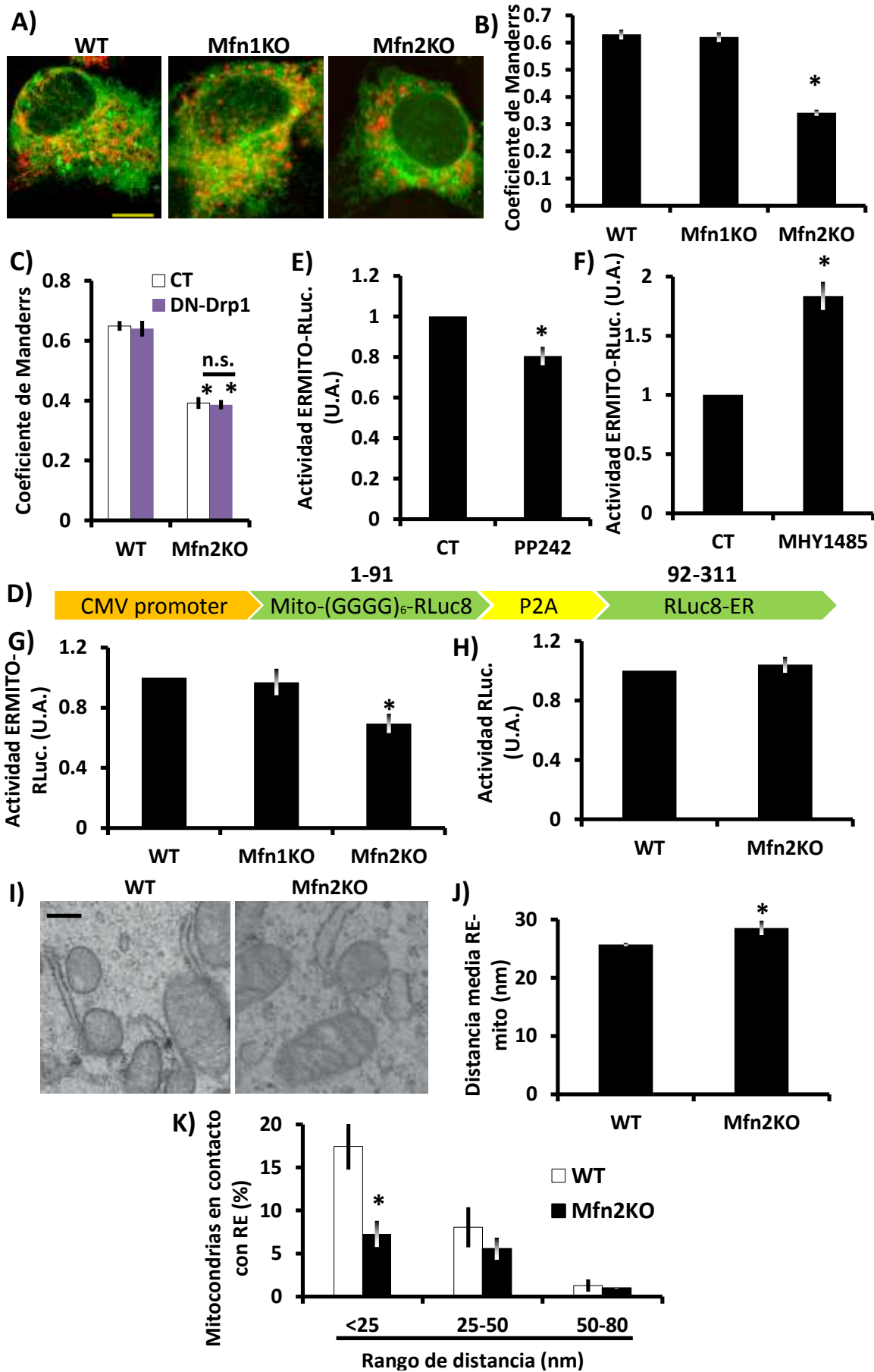


Figura 26: A) Imágenes representativas de células WT, Mfn1KO y Mfn2KO co-transfectadas con mito-RFP y RE-GFP. Barra de escala: 5µm. B) Después de 48h, las células fueron fijadas y el grado de colocalización entre RE y mitocondrias fue analizado mediante el coeficiente de Manders, el cual cuantifica la sobreposición entre pixels verdes y rojos, respectivamente (n=30 células en 3 experimentos independientes). C) El coeficiente de Manders fue medido en células WT y Mfn2KO co-transfectadas con mito-RFP, RE-GFP y DN-Drp1 o un plásmido control (n=30 células en 3 experimentos independientes). D) Representación esquemática de la construcción ERMITO-RLuc, la cual está bajo control de un promotor de CMV, tiene una parte dirigida a RE (residuos 1-91), otra a mitocondria (residuos 92-311) y un péptido auto-degradable que permite su separación. Se midió la actividad RLuc en células WT transfectadas con ERMITO-RLuc y tratadas con (E) el inhibidor mTOR PP242 (25µM) o (D) el activador de mTOR MHY 1485 (10µM) (n=6 experimentos independientes). G) Se midió la actividad RLuc en células WT, Mfn1KO y Mfn2KO transfectadas con ERMITO-RLuc (n=3 experimentos independientes). H) Se midió la actividad RLuc en células WT y Mfn2KO transfectadas con la forma entera de Luciferasa *Renilla* bajo el promotor de CMV (n=3 experimentos independientes). I) Imágenes representativas tomadas mediante microscopia electrónica de transmisión de células WT y Mfn2KO. Barra de escala: 250nm. J) Distancia media de los contactos RE-mitocondria en células WT y Mfn2KO (n=111-168 mitocondrias). K) Cuantificación del porcentaje de contactos entre mitocondrias-RE dividido en tres rangos según la distancia (n=627-779 mitocondrias de 68-98 células en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media ± SEM. *p<0,05, prueba t de Student o ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

descartar que la disminución observada en las células Mfn2KO fuese consecuencia de una menor accesibilidad del substrato de reacción a estas células o a alteraciones en la eficiencia de transfección, se realizó el mismo ensayo pero utilizando la RLuc completa. En este caso, no se observaron diferencias entre la línea WT y Mfn2KO (Fig.26H), por lo que se descartó un posible sesgo en los resultados obtenidos.

Por último, para acabar de corroborar el efecto negativo que produce la falta de Mfn2 sobre las MAMS, Guillem Riqué, integrante del grupo de investigación, procedió a realizar un análisis comparativo de las líneas WT y Mfn2KO mediante microscopia electrónica. Esta aproximación se abordó desde dos puntos de vista, siendo el primero de ellos la medida de la distancia media de todos aquellos contactos entre mitocondrias y RE considerados MAMs, es decir, de hasta 80 nm de distancia (Giacomello & Pellegrini 2016). Tras realizar esta medida, se observó un ligero, pero estadísticamente significativo, aumento en la distancia de las MAMs de la línea Mfn2KO (Fig.26I, J). Por otro lado, se midió en tres rangos distintos el porcentaje de mitocondrias en contacto con el RE, según la distancia del contacto: menor de 25 nm, entre 25-50 nm y entre 50-80 nm. En este caso, se observó una clara disminución en el porcentaje de mitocondrias de las células Mfn2KO que estaban formando contactos de

menos de 25 nm con el RE (Fig.26K), los contactos óptimos para la transferencia de Ca^{2+} entre ambos orgánulos (Giacomello & Pellegrini 2016). Por su parte, no se observaron diferencias significativas en los otros dos rangos medidos.

Por lo tanto, se puede concluir con solidez que en el modelo experimental utilizado en este trabajo Mfn2 promueve los contactos RE-mitocondria, actuando como enlazador de estos orgánulos.

La falta de Mfn2 afecta negativamente la homeostasis del Ca^{2+}

Debido a la alteración observada en la distancia de las MAMs frente a la falta de Mfn2, especialmente en los contactos con distancia óptima para el intercambio de Ca^{2+} , se decidió analizar si también existían perturbaciones en la homeostasis del Ca^{2+} . Primeramente se monitorizó la cantidad de Ca^{2+} mitocondrial mediante la sonda fluorescente Rhod-2, la cual emite fluorescencia de manera dependiente al Ca^{2+} intramitocondrial. La fluorescencia inespecífica de la sonda se determinó usando CCCP, el cual desacopla el gradiente de protones establecido durante la actividad de la cadena transportadora de electrones y en consecuencia previene la captación de Ca^{2+} (Mccarron et al. 2013). Tras realizar este ensayo se observaron unos niveles de Ca^{2+} mitocondrial menores únicamente en las células Mfn2KO (Fig.27A). Dado que Rhod-2 tiene carácter catiónico, se acumula en las mitocondrias en respuesta al MMP (Boitier et al. 1999), por lo que se puede pensar que la disminución observada en su señal viene producida como consecuencia de que las células Mfn2KO tengan menor MMP (Fig.21A). Por este motivo, se decidió medir el Ca^{2+} mitocondrial siguiendo dos estrategias más. Por un lado, se utilizó el sensor genético de Ca^{2+} intramitocondrial *Cepia3mt* (Kanemaru et al. 2020) y se observó de nuevo una menor cantidad de Ca^{2+} mitocondrial (Fig.27B). Por otro lado, se midió el Ca^{2+} citoplasmático mediante la sonda Fluo-4, y tras desacoplar las mitocondrias con CCCP, también se observó un menor aumento en los niveles de Ca^{2+} citoplasmático (Fig.27C), provocado por una menor cantidad de Ca^{2+} liberado desde las mitocondrias. Por lo tanto, se puede concluir que las mitocondrias de las células Mfn2KO tienen menos Ca^{2+} .

A continuación, se monitorizó la cantidad de Ca^{2+} del RE mediante un sensor genético de Ca^{2+} que está dirigido al RE, llamado ER-LAR-GECO1, el cual emite fluorescencia de

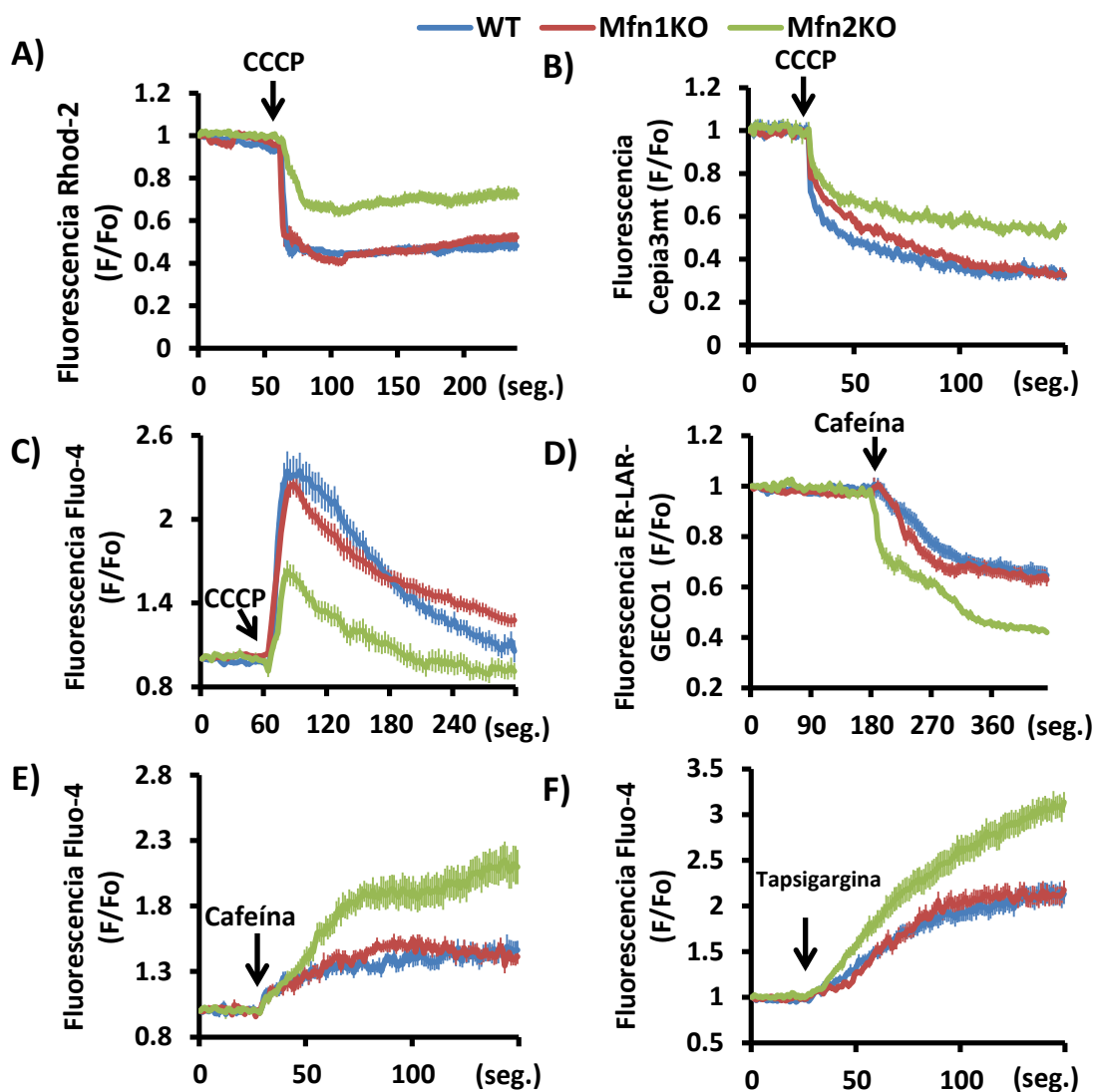


Figura 27: Determinación de Ca^{2+} mitocondrial mediante (A) la sonda Rhod-2 ($5\mu\text{M}$) o (B) el sensor genético Cepia3mt en células WT, Mfn1KO y Mfn2KO. La fluorescencia se midió cada segundo y el Ca^{2+} mitocondrial fue liberado al aplicar CCCP ($10\mu\text{M}$) en el momento indicado ($n=40$ células analizadas en 4 experimentos independientes). C) El Ca^{2+} mitocondrial fue liberado de las mitocondrias aplicando CCCP ($10\mu\text{M}$) y el incremento en el Ca^{2+} citoplasmático fue monitorizado mediante la sonda Fluo-4 ($2\mu\text{M}$) ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). D) El Ca^{2+} del RE fue analizado mediante el sensor genético ER-LAR-GECO. La fluorescencia fue medida cada 3 segundos y el Ca^{2+} fue liberado del RE tratando con cafeína (20mM) en el momento indicado ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). El incremento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático fue monitorizado mediante la sonda Fluo-4 ($2\mu\text{M}$) al liberar el Ca^{2+} del RE después de tratar con (E) cafeína (20mM) o (F) tapsigargina ($1\mu\text{M}$) en el momento indicado ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p<0,05$, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

manera dependiente a la cantidad de Ca^{2+} que se encuentra en el interior del RE (Wu et al. 2014). Tras liberar el Ca^{2+} del RE a través de la activación de los canales RyR mediante el uso de cafeína (Kong et al. 2008), se observó una mayor salida de Ca^{2+} en

el RE de las células Mfn2KO (Fig.27D). De manera concomitante, midiendo el Ca^{2+} citoplasmático tras estimular la salida de Ca^{2+} del RE con cafeína, se observó un aumento mayor en las células Mfn2KO (Fig.27E). Para obtener mayor solidez en nuestros resultados, se utilizó otra estrategia para determinar los niveles de Ca^{2+} del RE. Para ello se usó tapsigargina, la cual inhibe los canales SERCA evitando así la reentrada de Ca^{2+} hacia el RE (Treiman et al. 1998), y se observaron de nuevo unos mayores niveles de Ca^{2+} en el RE de células Mfn2KO (Fig.27F).

La falta de Mfn2 altera la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias

La distancia en las MAMs es fundamental en la transferencia de Ca^{2+} entre RE y mitocondrias (Rizzuto et al. 1998; Giacomello & Pellegrini 2016). Tal y como se ha visto, la deficiencia en Mfn2 provoca una alteración en la distancia de los contactos RE-mitocondrias, así como perturbaciones en los niveles de Ca^{2+} mitocondriales y del RE. Contrariamente, la deficiencia en Mfn1 no causa ninguna de estas variaciones. Siguiendo estos resultados, se decidió monitorizar si estos cambios eran debidos a alteraciones en el proceso de transferencia de Ca^{2+} del RE hacia las mitocondrias. Para ello, se analizó el Ca^{2+} mitocondrial mediante Rhod-2 tras estimular la salida de Ca^{2+} del RE con cafeína y se observó que en células Mfn2KO se producía un aumento menor en el Ca^{2+} captado por las mitocondrias (Fig.28A). Para corroborar que el Ca^{2+} captado por las mitocondrias provenía efectivamente del RE, y no de un mecanismo alternativo, se bloquearon los canales RyR mediante el uso de dantroleno (Zhao et al. 2001; Win Oo et al. 2015), y se confirmó que, en efecto, el Ca^{2+} provenía del RE (Fig.28B). Aunque hay evidencias del papel de los canales RyR en la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias (Szalait et al. 2000; Guidarelli et al. 2019), el mecanismo más ampliamente estudiado y validado es el que implica los canales IP_3R (Szabadkai et al. 2006; Cárdenas et al. 2010; Monaco et al. 2012; Kaufman & Malhotra 2014). Por este motivo, se decidió monitorizar el Ca^{2+} mitocondrial tras aplicar ATP e histamina, dos activadores de los canales IP_3R (Bezprozvanny & Ehrlich 1993; Sampieri et al. 2018). En este caso, de nuevo se observó un aumento menos pronunciado en el Ca^{2+} mitocondrial de las células Mfn2KO tanto aplicando ATP (Fig.28C) como histamina (Fig.28D), por lo que la alteración en la transferencia de Ca^{2+} sucede tanto vía RyR como IP_3R .

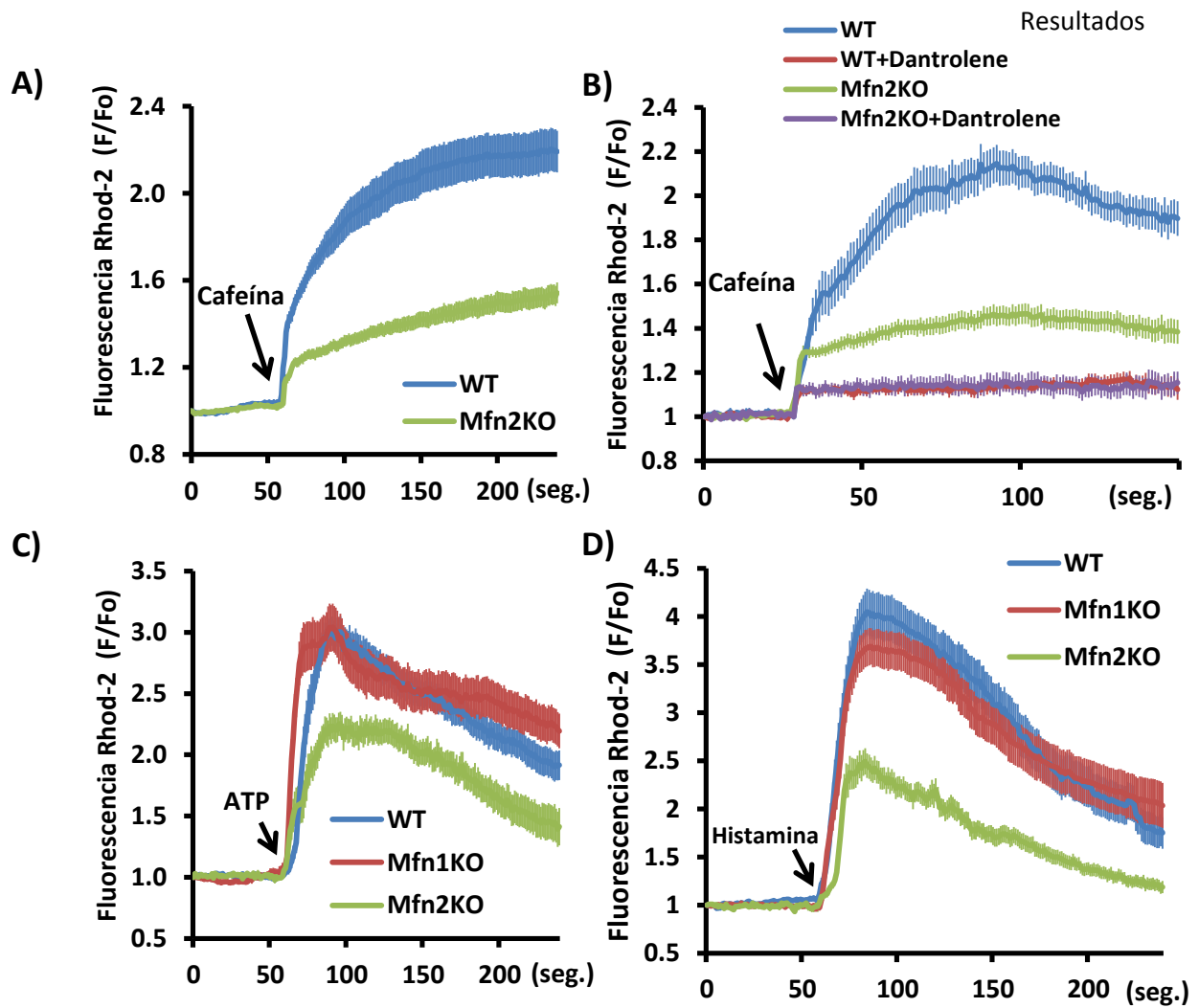


Figura 28: A) El Ca^{2+} mitocondrial fue determinado al liberar el Ca^{2+} del RE a través de los canales RyR aplicando cafeína (20mM) en el momento indicado en células WT y Mfn2KO. La fluorescencia de Rhod-2 (5 μM) fue medida cada segundo (n=30 células analizadas en 3 experimentos independientes). B) Se realizó el mismo ensayo, tratando previamente 24h con solvente o dantroleno (10 μM), para inhibir los canales RyR (n=30 células analizadas en 3 experimentos independientes). El Ca^{2+} mitocondrial fue determinado en células WT, Mfn1KO y Mfn2KO tras liberar el Ca^{2+} del RE a través de los canales IP₃R tratando con (C) ATP (100 μM) o (D) histamina (100 μM). La fluorescencia de Rhod-2 (5 μM) fue medida cada segundo (n=30 células analizadas en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. *p<0,05, prueba t de Student o ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

La alteración en la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias en células Mfn2KO no se debe a su menor MMP

La captación de Ca^{2+} mitocondrial es un proceso dependiente del gradiente electroquímico generado a través de la MMI, es decir, el MMP es la fuerza que lo dirige (Duchen 2000). La respiración mitocondrial permite establecer el MMP, pero a su vez, el Ca^{2+} mitocondrial es esencial en la estimulación de la respiración mitocondrial (Cárdenas et al. 2010). Por lo tanto, esta retroalimentación entre ambos procesos hace

surgir la duda de si la menor captación de Ca^{2+} mitocondrial observada en las células Mfn2KO es consecuencia de su menor MMP o viceversa. Para esclarecer este dilema, las células se trataron con metil-piruvato, el cual traspasa libremente la MMI (Rossi et al. 2020), hecho que permitió la recuperación del MMP de las células deficientes en Mfn2 (Fig.29A). No obstante, cuando se monitoriza la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias después de estimular la salida de Ca^{2+} del RE, se observa un ligero aumento en la captación de Ca^{2+} en las células Mfn2KO, pero que se encuentra alejado de los valores obtenidos en células WT (Fig.29B). Por lo tanto, la disminución en la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias de las células Mfn2KO no es una consecuencia de un menor MMP, más bien la disminución de Ca^{2+} mitocondrial podría ser la causa de un menor MMP.

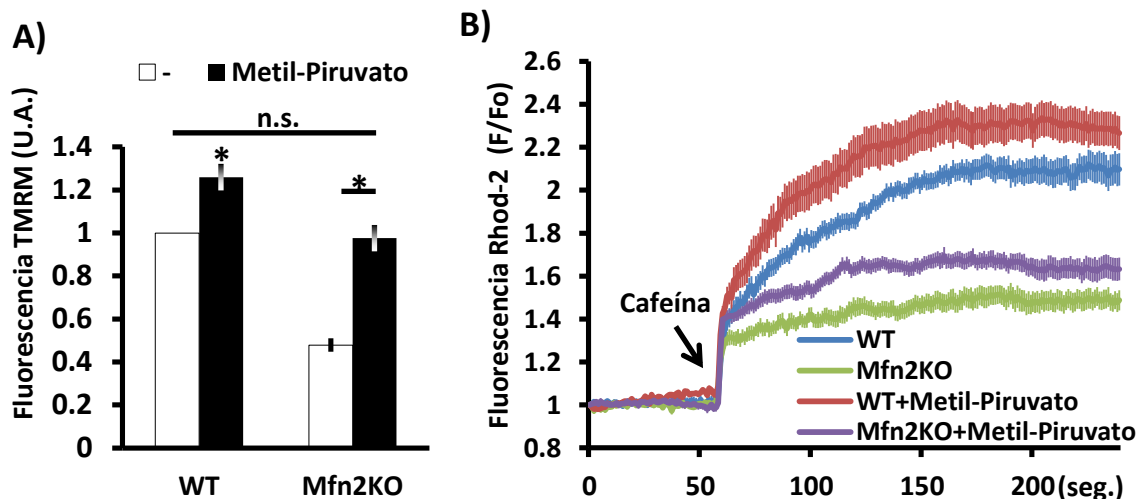


Figura 29: A) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) en células WT y Mfn2KO después de ser tratadas con solvente o metil-piruvato (5mM) durante 24 h (n=90 células en 3 experimentos independientes). B) El Ca^{2+} mitocondrial fue determinado al liberar el Ca^{2+} del RE a través de los canales RyR aplicando cafeína (20mM) en el momento indicado en células WT y Mfn2KO tratadas previamente 24h con solvente o metil-piruvato (5mM). La fluorescencia de Rhod-2 (5 μ M) fue medida cada segundo (n=30 células analizadas en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

La falta de Mfn2 induce la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa

El Ca^{2+} mitocondrial lleva a cabo la activación directa de varias deshidrogenasas mitocondriales, potenciando de este modo el metabolismo mitocondrial (Sassano et al. 2017). Una de estas enzimas es la piruvato deshidrogenasa (PDH), la cual se activa a través de su desfosforilación (Denton et al. 1980). Tal como se ha mostrado previamente, en la línea Mfn2KO se observaron unos niveles de Ca^{2+} mitocondrial más

bajos (Fig.27A-C), hecho que sugiere que podría estar afectando al metabolismo mitocondrial a través de este mecanismo. Mediante *Western Blot*, se comprobó que efectivamente en la línea Mfn2KO la enzima PDH está más fosforilada y por lo tanto, inactiva (Fig.30A-C), hecho que denota una menor actividad del metabolismo mitocondrial en estas células.

Todos estos resultados en conjunto sugieren que los defectos observados en la bioenergética mitocondrial en la línea Mfn2KO pueden ser debidos a alteraciones en el intercambio de Ca^{2+} entre RE y mitocondrias.

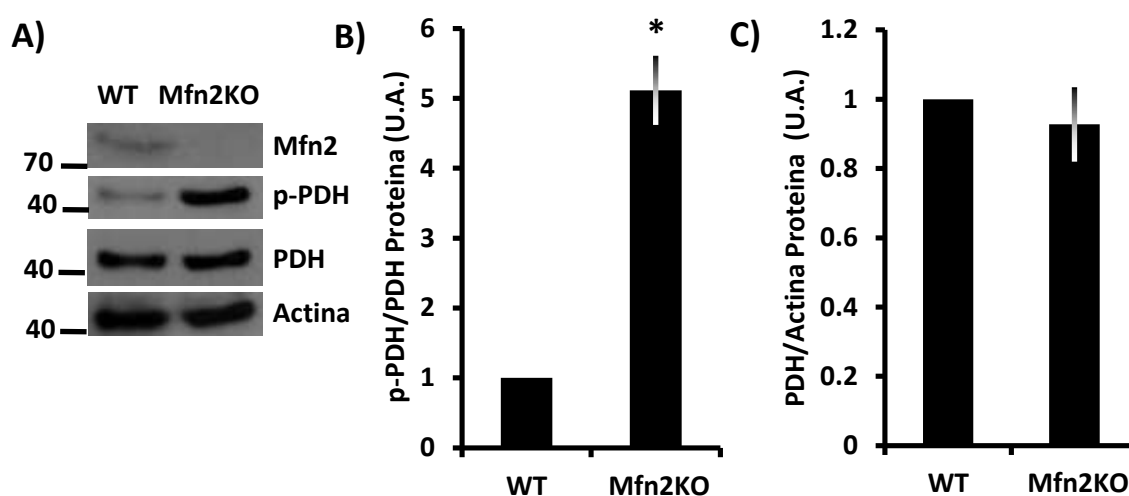


Figura 30: A-C) *Western Blots* representativos y análisis densitométricos de las proteínas indicadas en MEFs WT y Mfn2KO (n=3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, prueba t de Student.

1.4. La unión artificial RE-mitocondrias corrige los defectos en la bioenergética mitocondrial y la homeóstasis del Ca^{2+}

La expresión de un enlazador artificial RE-mitocondria permite reestablecer los contactos entre ambos orgánulos

Tras los resultados anteriores, se pensó que la pérdida de los contactos RE-mitocondria podría estar causando las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial, que a su vez parece comprometer la bioenergética mitocondrial. Es por ese motivo que se decidió mimetizar la función enlazadora de Mfn2, pero en células sin Mfn2, mediante

la sobreexpresión de un enlazador artificial RE-mitocondria, para así poder validar que esa es la función concreta de Mfn2 que está implicada en este mecanismo.

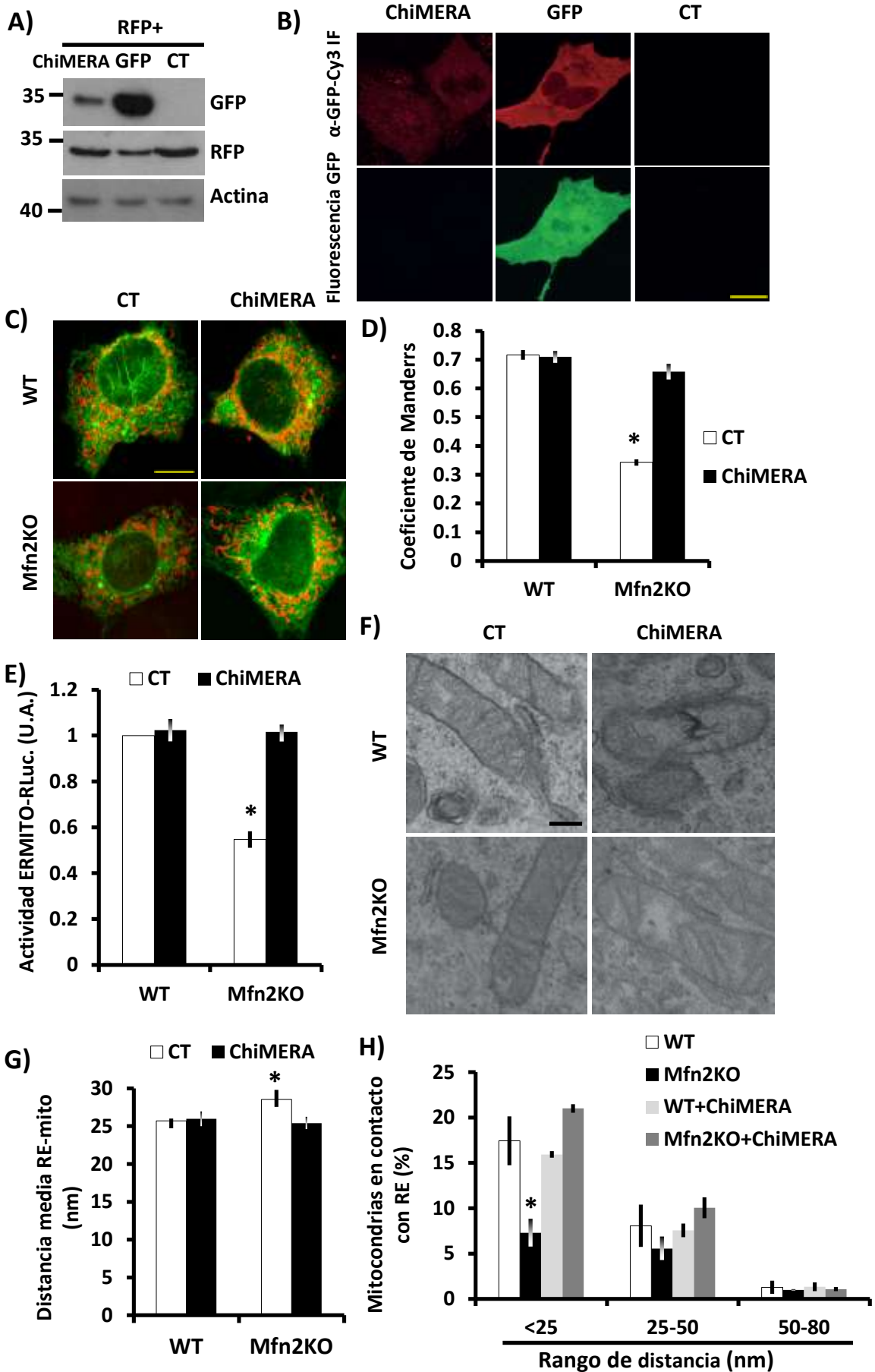


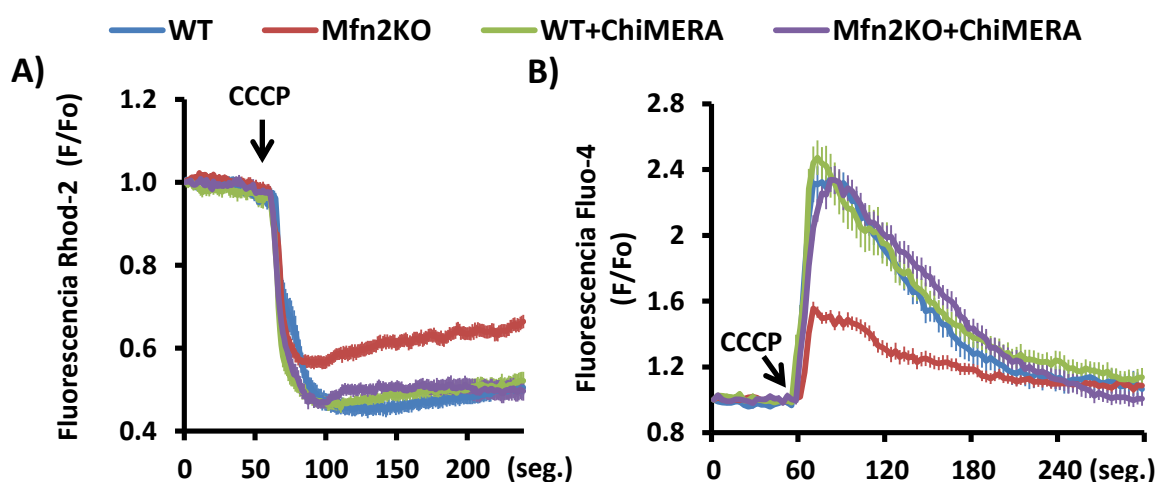
Figura 31: A) *Western Blots* representativos de las proteínas indicadas en fibroblastos Mfn2KO co-transfectados con plásmidos que expresaban RFP y ChiMERA, GFP o un plásmido control (n=3 experimentos independientes). B) Imágenes representativas de células Mfn2KO tomadas mediante microscopia confocal, las cuales han sido transfectadas con ChiMERA, GFP o un plásmido control. La fluorescencia verde no se observa en las células que expresan ChiMERA, a no ser que se detecte su GFP conjugado mediante una inmunofluorescencia indirecta de tres pasos con anticuerpos anti-GFP. Barra de escala: 5µm. C) Imágenes representativas de células WT y Mfn2KO co-transfectadas con mito-RFP, RE-GFP y ChiMERA o plásmido control. Barra de escala: 5µm. D) Después de 48h, las células fueron fijadas y el grado de colocalización entre RE y mitocondrias fue analizado mediante el coeficiente de Manders (n=15 células analizadas en 3 experimentos independientes). E) Se midió la actividad RLuc en células WT y Mfn2KO co-transfectadas con ERMITO-RLuc y ChiMERA o plásmido control (n=3 experimentos independientes). F) Imágenes representativas tomadas mediante microscopia electrónica de transmisión de células WT y Mfn2KO transfectadas con ChiMERA o plásmido control. Barra de escala: 250nm. J) Distancia media de los contactos RE-mitocondria (n=111-193 mitocondrias). K) Cuantificación del porcentaje de contactos entre mitocondrias-RE divididos en tres rangos según la distancia (n=598-779 mitocondrias de 68-98 células en 3 experimentos independientes). Nótese que los controles de estos experimentos y las Fig.26J y Fig.26K son los mismos valores ya que se hicieron a la vez, pero se han dividido las figuras por el bien de la linealidad del estudio. Los resultados se presentan como la media ± SEM. *p<0,05, prueba t de Student o ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

Tanto la pérdida de contactos ER-mitocondrias como un exceso en los mismos son perjudiciales para la célula (Scorrano et al. 2003; Csordás et al. 2006; Cárdenas et al. 2016). Para evitar justamente este problema, se usó una proteína enlazadora artificial codificada en un vector de expresión de levadura, llamada ChiMERA (Kornmann et al. 2009), y así obtener una baja expresión de dicho enlazador. Esta proteína consiste en una proteína GFP flanqueada por señales de localización tanto a RE como a mitocondria, por lo que se midieron sus niveles de expresión mediante *Western Blot* e inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-GFP. En *Western Blot*, usando la transfección de la proteína GFP *wild-type* como control junto con RFP, se verificó una expresión mucho menor cuando se transfectaba con ChiMERA (Fig.31A). Estos niveles más bajos en ChiMERA no se debieron a una menor eficiencia de transfección, como indican los niveles de RFP, proteína utilizada para separar previamente mediante citometría de flujo únicamente las células transfectadas. Por su parte, mediante microscopía confocal, a diferencia del GFP *wild-type*, no se observaba señal del GFP de ChiMERA (Fig.31B). Esta señal solo podía ser observada tras realizar una inmunofluorescencia indirecta de tres pasos con estreptavidina conjugada a un fluorocromo rojo (para diferenciar la señal de la propia del GFP). La capacidad de ChiMERA para reestablecer los contactos fue confirmada mediante tres

aproximaciones: el coeficiente de Manders (Fig.31C, D), la actividad ERMITO-RLuc (Fig.31E) y microscopía electrónica (Fig.31F-H). En esta última aproximación, llevada a cabo por Guillem Riqué, cabe destacar que su efecto enlazador se produce sobre todo en contactos menores de 25 nm (Fig.31H), la distancia óptima para el intercambio de Ca^{2+} (Giacomello & Pellegrini 2016).

La unión artificial RE-mitocondrias restaura la homeostasis del Ca^{2+}

Tras comprobar que el enlazador artificial ChiMERA reproduce de manera fidedigna la función enlazadora de Mfn2 y su alta capacidad para reestablecer contactos de menos de 25 nm, posteriormente se procedió a monitorizar los niveles de Ca^{2+} en ambos orgánulos. En relación al Ca^{2+} mitocondrial, se midió tanto de manera directa con Rhod-2 (Fig.32A) como indirecta, es decir, midiendo el Ca^{2+} citoplasmático (Fig.32B), al vaciar todo el contenido de Ca^{2+} almacenado en las mitocondrias tras desacoplarlas con CCCP. Ambas medidas coincidieron en que los niveles de Ca^{2+} mitocondrial se reestablecían al sobreexpresar ChiMERA. Del mismo modo, también se reestablecieron los niveles de Ca^{2+} liberado del RE tras estimular con cafeína (Fig.32C). Finalmente, sobreexpresando ChiMERA también se consiguió reestablecer la captación de Ca^{2+} hacia las mitocondrias cuando se libera desde el RE, ya sea a través de los canales RyR (Fig.32D) o IP₃R (Fig.32E).



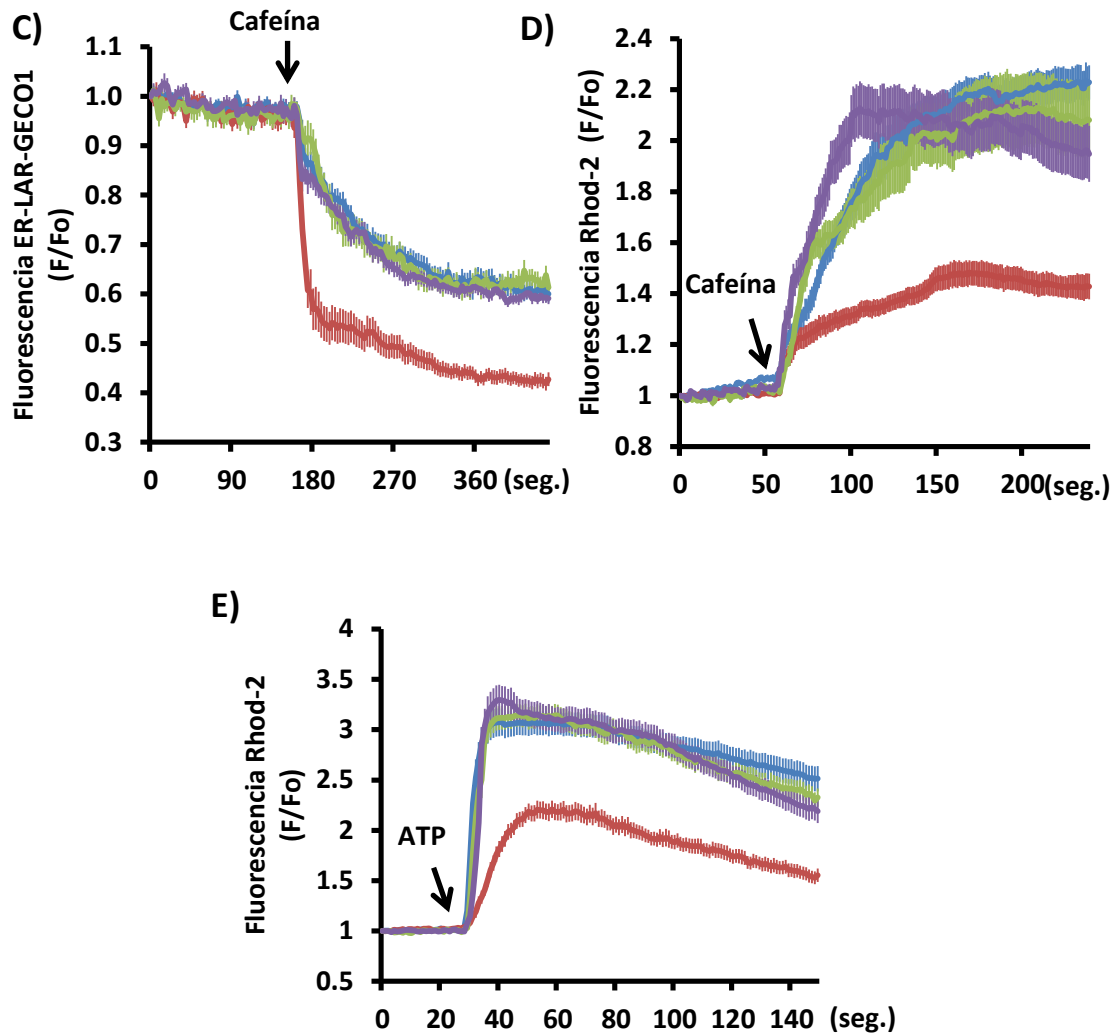
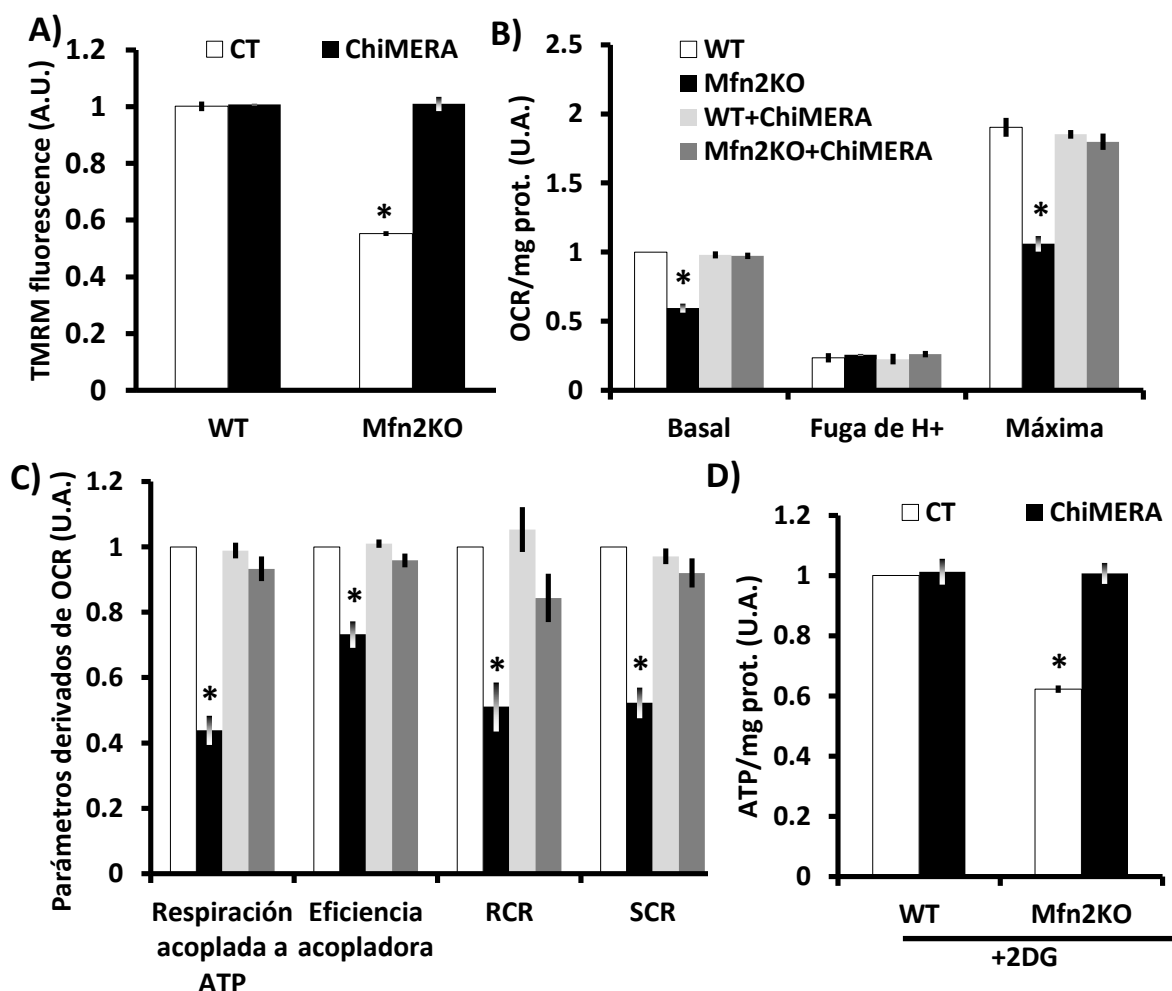


Figura 32: A) Determinación de Ca^{2+} mitocondrial mediante la sonda Rhod-2 ($5\mu\text{M}$) en células WT y Mfn2KO transfectadas con ChiMERA o plásmido control. La fluorescencia se midió cada segundo y el Ca^{2+} mitocondrial fue liberado al aplicar CCCP ($10\mu\text{M}$) en el momento indicado ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). B) El Ca^{2+} mitocondrial fue liberado de las mitocondrias aplicando CCCP ($10\mu\text{M}$) y el incremento en el Ca^{2+} citoplasmático fue monitorizado mediante la sonda Fluo-4 ($2\mu\text{M}$) ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). C) El Ca^{2+} del RE fue analizado mediante el sensor genético ER-LAR-GECO. La fluorescencia fue medida cada 3 segundos y el Ca^{2+} fue liberado del RE tratando con cafeína (20mM) en el momento indicado ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). El Ca^{2+} mitocondrial fue determinado al liberar el Ca^{2+} del RE a través de (D) los canales RyR aplicando cafeína (20mM) o de (E) los canales IP_3R aplicando ATP ($100\mu\text{M}$) en el momento indicado. La fluorescencia de Rhod-2 ($5\mu\text{M}$) fue medida cada segundo ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p<0,05$, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

La unión artificial RE-mitocondrias reestablece la bioenergética mitocondrial sin alterar la morfología mitocondrial

Dado a que los resultados expuestos inicialmente sugerían que el mecanismo a través del cual Mfn2 podía estar regulando la bioenergética mitocondrial involucraba las

MAMs y el intercambio de Ca^{2+} , se quiso comprobar si el enlazador artificial también recuperaba la bioenergética mitocondrial. Para ello se volvió a medir el MMP (Fig.33A), el perfil de OCR (Fig.33B), los diferentes parámetros obtenidos a partir del mismo (Fig.33C), y el ATP producido por las mitocondrias (Fig.33D). Todos estos ensayos concuerdan en que el déficit bioenergético observado en las mitocondrias frente a la falta de Mfn2, se solventa cuando ambos orgánulos son enlazados de manera artificial. Además, de nuevo queda patente la independencia de este mecanismo con la dinámica mitocondrial, ya que la sobreexpresión de ChiMERA no interviene en la función de Mfn2 relacionada con la fusión mitocondrial, tal y como se observa en los distintos análisis de morfología mitocondrial (Fig.33E-H).



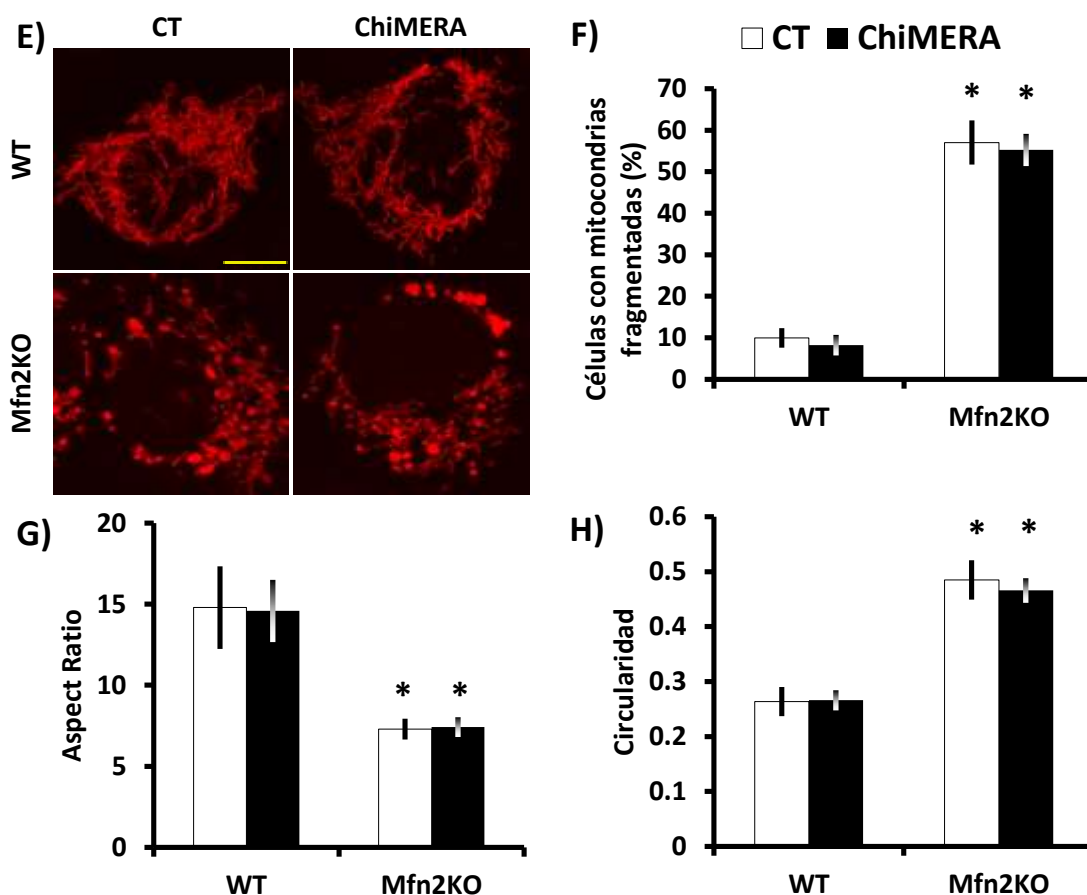
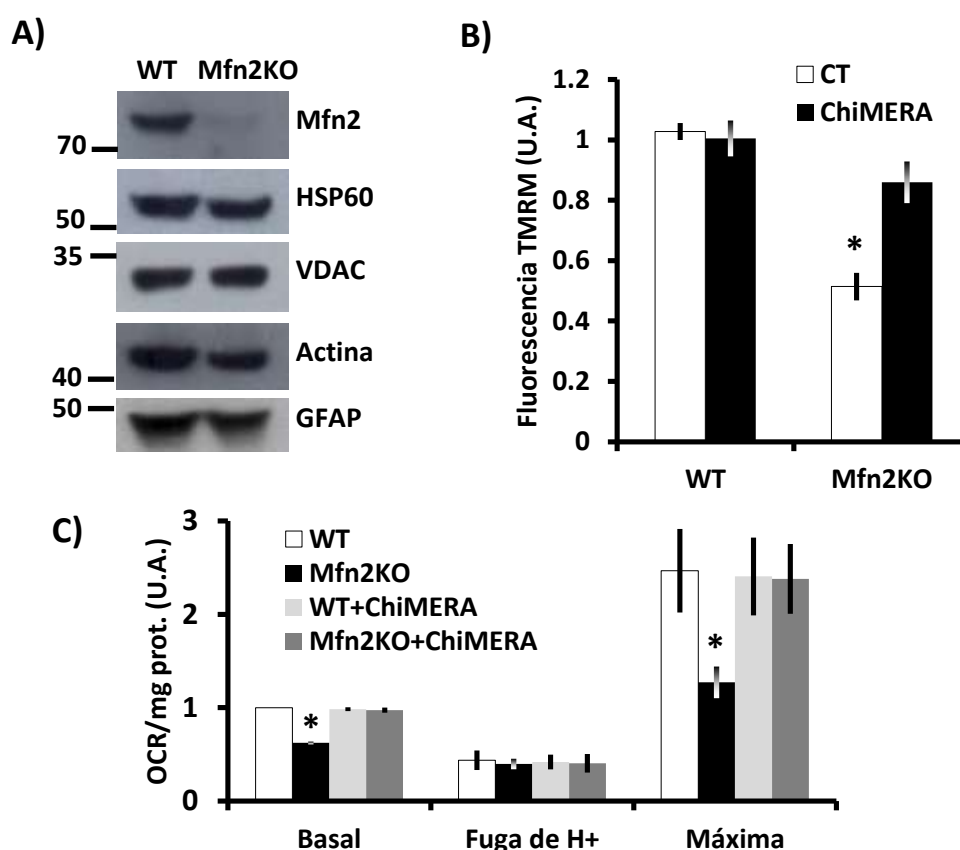


Figura 33: A) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) en células WT y Mfn2KO transfectadas con ChiMERA o plásmido control (n=90 células en 3 experimentos independientes). B) El OCR fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra. Para obtener las diferentes medidas se aplicó oligomicina (1μM) y CCCP (10μM) tal como se describe en el apartado de materiales y métodos (n=3 experimentos independientes). C) Los parámetros derivados del OCR se calcularon de la manera descrita en el apartado de materiales y métodos. D) Las células fueron incubadas durante 6h con 2DG (10mM) y entonces se midieron los niveles de ATP (n= 3 experimentos independientes). E) Imágenes representativas de células WT y Mfn2KO co-transfectadas 48h con mito-RFP y ChiMERA o plásmido control. Barra de escala: 5μm. F) Porcentaje de células con mitocondrias globulares (n=175-408 células analizadas en 3 experimentos independientes). G) Análisis del Aspect Ratio calculado como eje mayor/eje menor y (H) circularidad calculada como $4 \cdot \pi \cdot \text{Area} / \text{Perímetro}^2$ (n=300 mitocondrias en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey.

ChiMERA también restaura el déficit bioenergético en astrocitos Mfn2KO

Aunque en general está aceptado que Mfn2 regula positivamente el metabolismo mitocondrial en diferentes tipos celulares (Bach et al. 2003; Sebastián et al. 2012; Segalés et al. 2013; Schneeberger et al. 2013; Martorell-Riera et al. 2014; Tur et al. 2020; Xu et al. 2020), existen discrepancias sobre algunos aspectos relacionados, como por ejemplo, en la fuga de H^+ acontecida durante la respiración mitocondrial. En

algunos modelos, como en células del músculo esquelético (Segalés et al. 2013) o fibroblastos con potencial miogénico (Bach et al. 2003), se ha observado un aumento en la fuga de H^+ ante la falta de Mfn2, mientras que en otros tipos celulares como neuronas (Schneeberger et al. 2013), adipocitos (Boutant et al. 2017), condrocitos (Xu et al. 2020) o macrófagos (Tur et al. 2020), no se han observado cambios. Ante estas discrepancias, se quisieron validar nuestros hallazgos en otro tipo celular, como son los astrocitos, para descartar que fueran efecto de un fenómeno específico de nuestro modelo. Concretamente, se usaron cultivos de astrocitos primarios de ratón, en los cuales se suprimió la expresión de Mfn2 mediante recombinación inducible por tamoxifeno (Fig.34A). Del mismo modo que los MEF, los astrocitos también mostraban defectos bioenergéticos, observados mediante el análisis del MMP (Fig.34B), OCR (Fig.34C-D) y ATP producido por las mitocondrias (Fig.34E). Además, la sobreexpresión de ChiMERA también permitía rescatar dichos defectos, por lo que los hallazgos mostrados hasta ahora no son exclusivos de los MEF y son reproducibles en otros tipos celulares, como es el caso de los astrocitos.



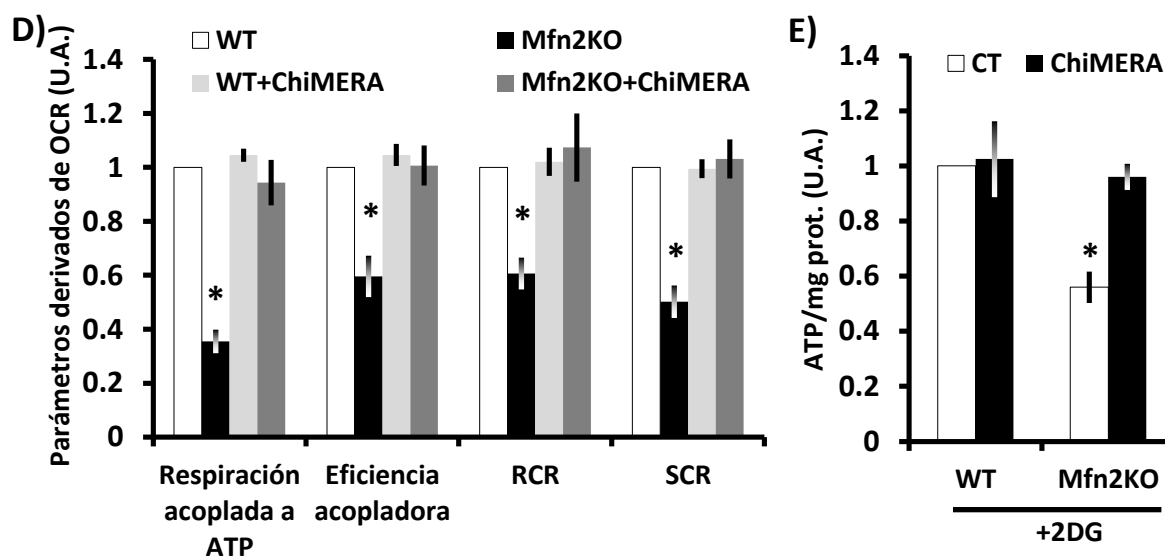


Figura 34: A) *Western Blots* representativos de las proteínas indicadas en cultivos de astrocitos Mfn2KO inducibles por tamoxifeno tras aplicar solvente o tamoxifeno (1 μ M) (n=3 experimentos independientes). B) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) en astrocitos WT y Mfn2KO transfectadas con ChiMERA o plásmido control (n=90 células en 3 experimentos independientes). C) El OCR fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra. Para obtener las diferentes medidas se aplicó oligomicina (1 μ M) y CCCP (10 μ M) tal como se describe en el apartado de materiales y métodos (n=3 experimentos independientes). D) Los parámetros derivados del OCR se calcularon de la manera descrita en el apartado de materiales y métodos. E) Los astrocitos fueron incubados durante 6h con 2DG (10mM) y entonces se midieron los niveles de ATP (n= 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey.

1.5. La activación de la bioenergética mitocondrial por ChiMERA requiere de la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias

El silenciamiento del canal MCU y el uso de los inhibidores 2APB y XeC bloquean el transporte de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias

En el transporte cíclico de Ca^{2+} entre RE y mitocondrias, el Ca^{2+} almacenado en el RE se libera principalmente a través de los canales IP₃R, difunde a través de la membrana mitocondrial externa (MME) por los canales VDAC y atraviesa la interna (MMI) mediante los canales MCU (Piedras-Renteria et al. 2012). Los resultados anteriores sugieren que la función enlazadora de Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial a través de la transferencia de Ca^{2+} . Para confirmar esta hipótesis se diseñaron dos estrategias distintas para bloquear el paso del Ca^{2+} del RE a las mitocondrias. Por un lado, se suprimió la expresión del canal MCU mediante la transfección con siRNA dirigidos contra MCU, tal y como se demuestra tanto a nivel de RNA (Fig.35A) como a

nivel proteico (Fig.35B, C). Efectivamente, el silenciamiento de este canal provocaba un bloqueo de la entrada de Ca^{2+} hacia las mitocondrias, tal y como queda patente mediante la monitorización de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial tras su liberación del RE a través de los canales IP_3R (Fig.35D). Por otro lado, se usaron dos inhibidores químicos del canal IP_3R , pero no relacionados entre sí, como son el 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB) (Ruiz et al. 2009) y la Xestospongina C (XeC) (Gafni et al. 1997), para descartar que el fenómeno observado se deba a posibles efectos inespecíficos de los mismos. De nuevo, monitorizando los niveles de Ca^{2+} mitocondrial tras la estimulación de los canales IP_3R , se pudo observar que tanto 2-APB (Fig.35E) como XeC (Fig. 35F) bloquearon de manera efectiva la salida de Ca^{2+} del RE, evitando así su captación por las mitocondrias.

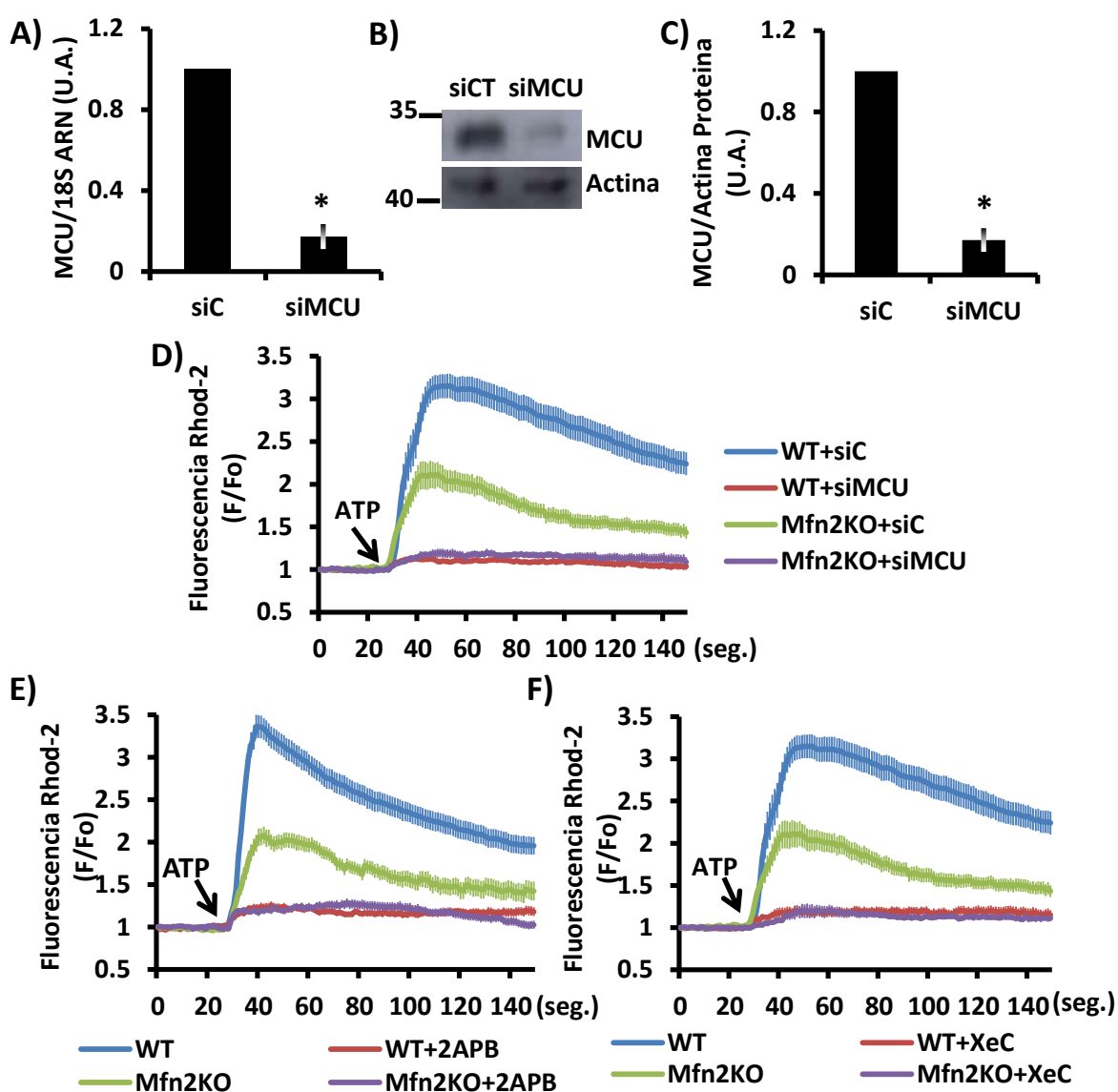


Figura 35: A, B) *Western Blot* representativo y análisis densitométrico de células WT transfectadas con siRNA control (siCT) o un *pool* de 4 siRNA dirigidos contra MCU (siMCU) (n=3 experimentos independientes). C) Niveles de RNA analizados mediante qPCR de células WT transfectadas con siC o siMCU (n=3 experimentos independientes). D) El silenciamiento de MCU inhibe la captación de Ca^{2+} hacia las mitocondrias cuando se libera desde el RE a través de los canales IP_3R aplicando ATP (100 μM) en el momento indicado (n=28-30 células en 3 experimentos independientes). La inhibición de los canales IP_3R por (E) 2APB (50 μM) o (F) XeC (1,5 μM) previene la captación de Ca^{2+} mitocondrial tras aplicar ATP (100 μM) en el momento indicado (n=30 células en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, prueba t de Student o ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

El bloqueo de la transferencia de Ca^{2+} entre RE y mitocondrias evita el restablecimiento de la bioenergética mitocondrial a pesar de sobreexpresar ChiMERA

Tras comprobar el bloqueo en la captación de Ca^{2+} mitocondrial que produce el silenciamiento de MCU, se analizaron los diferentes parámetros que definen la bioenergética mitocondrial, como son el MMP (Fig.36A), el OCR (Fig.36B, C) y el ATP producido por las mitocondrias (Fig.36D). En todos ellos, pese a sobreexpresar ChiMERA, la cual ya se ha demostrado previamente que permite recuperar la bioenergética mitocondrial en células Mfn2KO, ante el silenciamiento de MCU no lo conseguía. Por otro lado, abordando el bloqueo de la transferencia de Ca^{2+} mediante la inhibición de los canales IP_3R se obtuvieron unos resultados similares. Tanto usando 2-APB como XeC, se observó que aunque se sobreexpresara ChiMERA, las células Mfn2KO no equiparaban sus niveles bioenergéticos a los de las células WT ni en MMP (Fig.36E), ni en OCR basal (Fig.36F) ni en ATP producido en las mitocondrias (Fig.36G).

Cabe destacar que los niveles bioenergéticos que se observaron en las células WT a las cuales se les había bloqueado la transferencia de Ca^{2+} eran equiparables a los de las células Mfn2KO control. Además, el hecho de bloquear la transferencia de Ca^{2+} en las células Mfn2KO no conllevaba un efecto añadido en su déficit bioenergético. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias es el mecanismo por el cual Mfn2 estimula la bioenergética mitocondrial mediante los contactos RE-mitocondria.

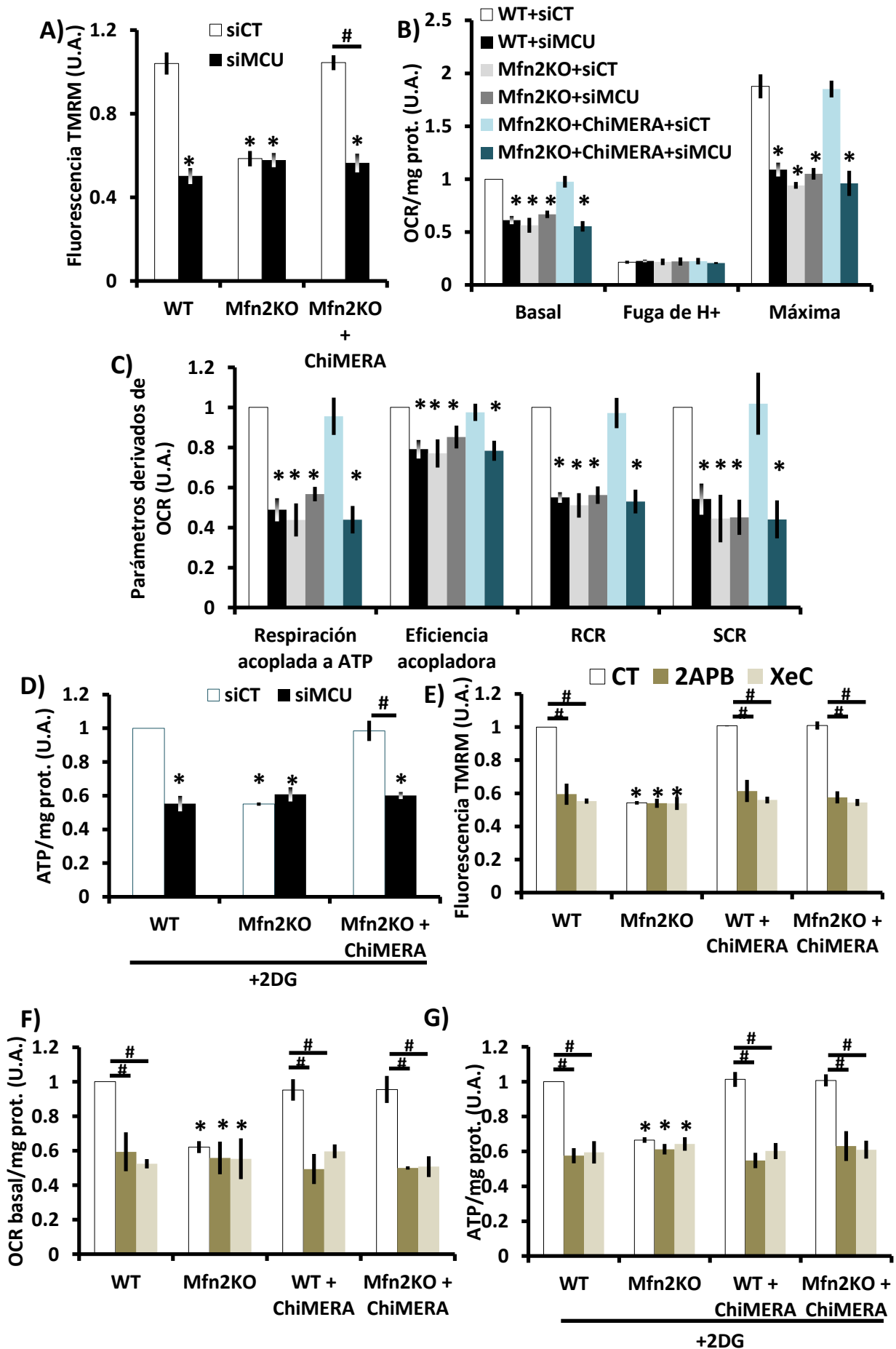
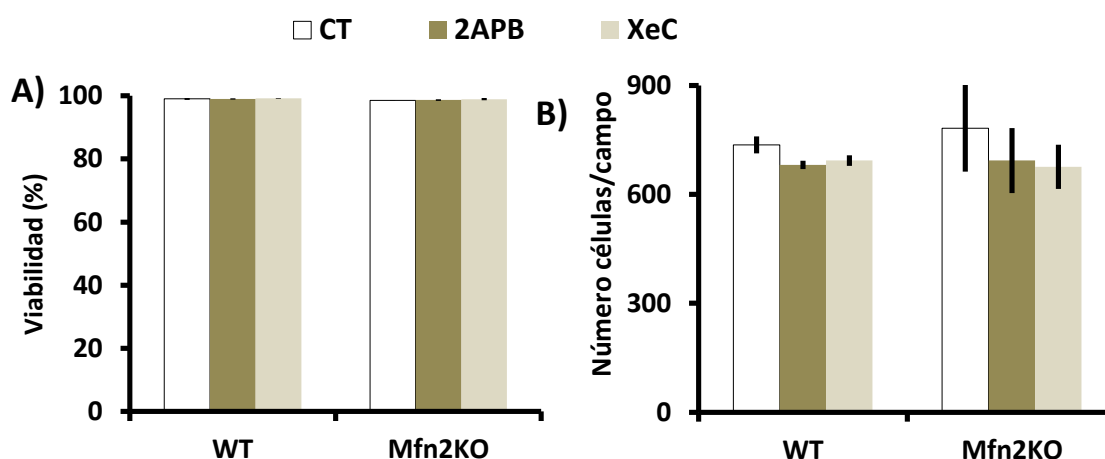


Figura 36: A) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) (n=90 células en 3 experimentos independientes). B) El OCR fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra. Para obtener las diferentes medidas se aplicó oligomicina (1μM) y CCCP (10μM) tal como se describe en el apartado de materiales y métodos (n=3 experimentos independientes). C) Los parámetros derivados del OCR se calcularon de la manera descrita en el apartado de materiales y métodos. D) Los fibroblastos fueron incubados durante 6h con 2DG (10mM) y entonces se midieron los niveles de ATP (n= 3 experimentos independientes). E) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) (n=90 células en 3 experimentos independientes). F) El OCR basal fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra. (n=3 experimentos independientes). G) Los fibroblastos fueron incubados durante 6h con 2DG (10mM) y entonces se midieron los niveles de ATP (n= 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media ± SEM. #p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05 respecto a su control.

El uso de inhibidores químicos no compromete la viabilidad celular

Mediante su papel inhibidor del IP₃R, se ha descrito que el uso de XeC puede inducir la activación de la mitofagia y en consecuencia alterar la masa mitocondrial (Criollo et al. 2007; Gomez-Suaga et al. 2017). Además, se ha descrito que el inhibidor 2-APB puede desencadenar respuestas celulares no fisiológicas que pueden comprometer la viabilidad celular a través de la alteración de los canales SOC, los cuales localizan en la membrana plasmática y se encargan de la entrada de iones hacia el citoplasma, sobretodo Ca²⁺ (Gregory et al. 2001; Huang et al. 2005). Por estos motivos, se decidió analizar la viabilidad (Fig.37A, B) y los niveles de las proteínas VDAC y HSP60 (Fig.37C-E), típicamente usadas como marcadores de masa mitocondrial, mediante *Western Blots* realizados por Guillem Riqué. En nuestro modelo no se observaron alteraciones en ninguno de estos parámetros tras el uso de los dos inhibidores químicos, por lo que el efecto observado no se debe a una pérdida de viabilidad celular o a una disminución de la masa mitocondrial.



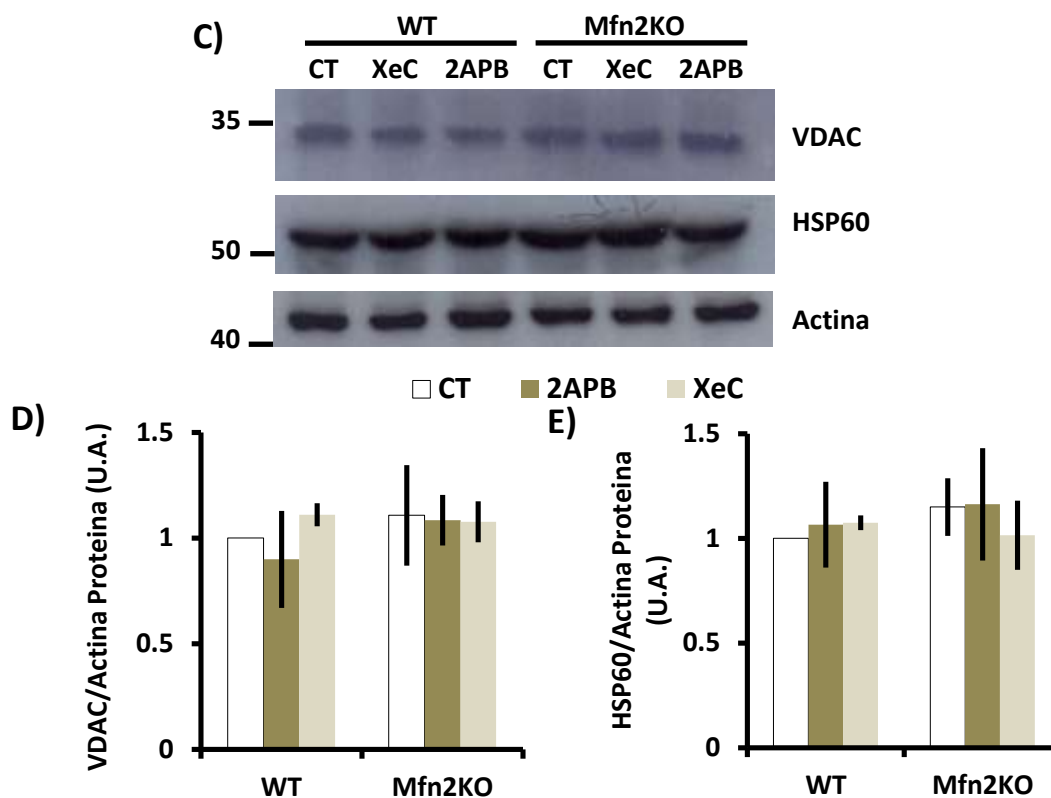


Figura 37: El tratamiento con 2APB (50 μ M) o XeC (1,5 μ M) durante 16h no afecta a la viabilidad de las células WT ni Mfn2KO. Se fijaron las células tras el tratamiento, se tiñeron los núcleos con DAPI y se contó (A) el porcentaje de núcleos no-picnóticos entre el total o (B) el número total de núcleos por campo analizado (n=697-1021 células en 3 experimentos independientes). C-E) *Western Blots* representativos y análisis densitométricos de las proteínas indicadas de células WT y Mfn2KO tratadas con 2APB (50 μ M), XeC (1,5 μ M) o solvente durante 16h (n=3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * p <0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

Las células Mfn2KO presentan menor expresión de MCU aunque no parece ser la causa de los defectos observados en la bioenergética mitocondrial

Existen discrepancias en relación a los niveles de expresión de MCU ante la falta de Mfn2 (Filadi et al. 2015; Naon et al. 2016), probablemente porque su expresión varía en función de la densidad celular (Naon et al. 2016). Dado que el canal MCU está relacionado directamente con la captación de Ca^{2+} mitocondrial, la cual regula la bioenergética mitocondrial (Cárdenas et al. 2010; Anelli et al. 2012; Carreras-Sureda et al. 2017a; Marchi et al. 2018), se decidió analizar los niveles de MCU mediante *Western Blot*, observándose niveles de expresión de MCU reducidos en las células Mfn2KO (Fig.38A, B). Por otro lado, la sobreexpresión de ChiMERA no consiguió recuperar los niveles basales de MCU (Fig.38A, B). El hecho de que la sobreexpresión

de ChiMERA sea suficiente para reestablecer la bioenergética mitocondrial y la homeostasis del Ca^{2+} sin modificar los niveles de expresión de MCU, sugiere que los niveles de expresión de MCU en las células Mfn2KO son suficientes para la captación de Ca^{2+} y que el factor limitante real es la proximidad entre RE y mitocondrias.

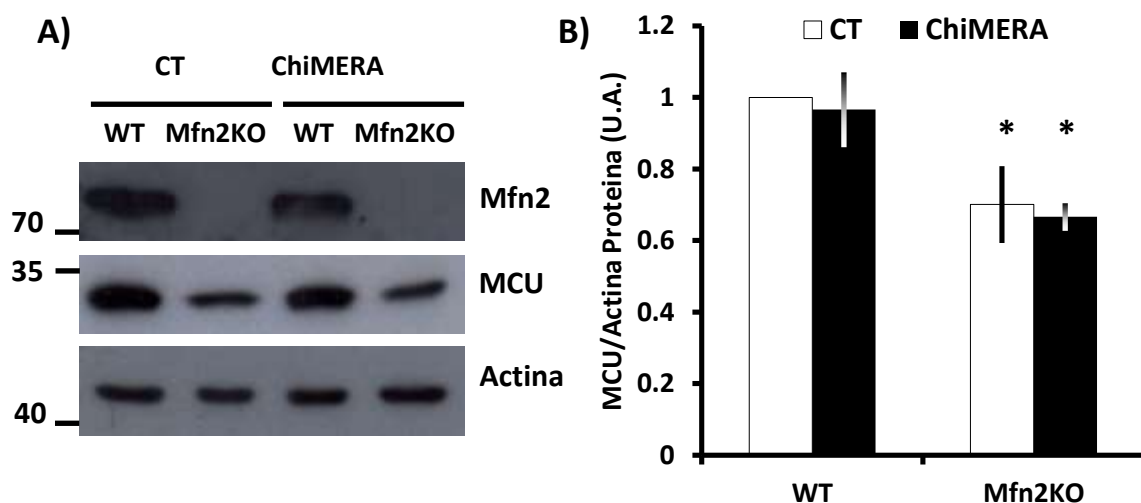


Figura 38: A, B) *Western Blots* representativos y análisis densitométrico de las proteínas indicadas de células WT y Mfn2KO transfectadas con ChiMERA o plásmido control (n=3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

2. Estudio de la interacción entre mitofusinas y su implicación en la bioenergética mitocondrial

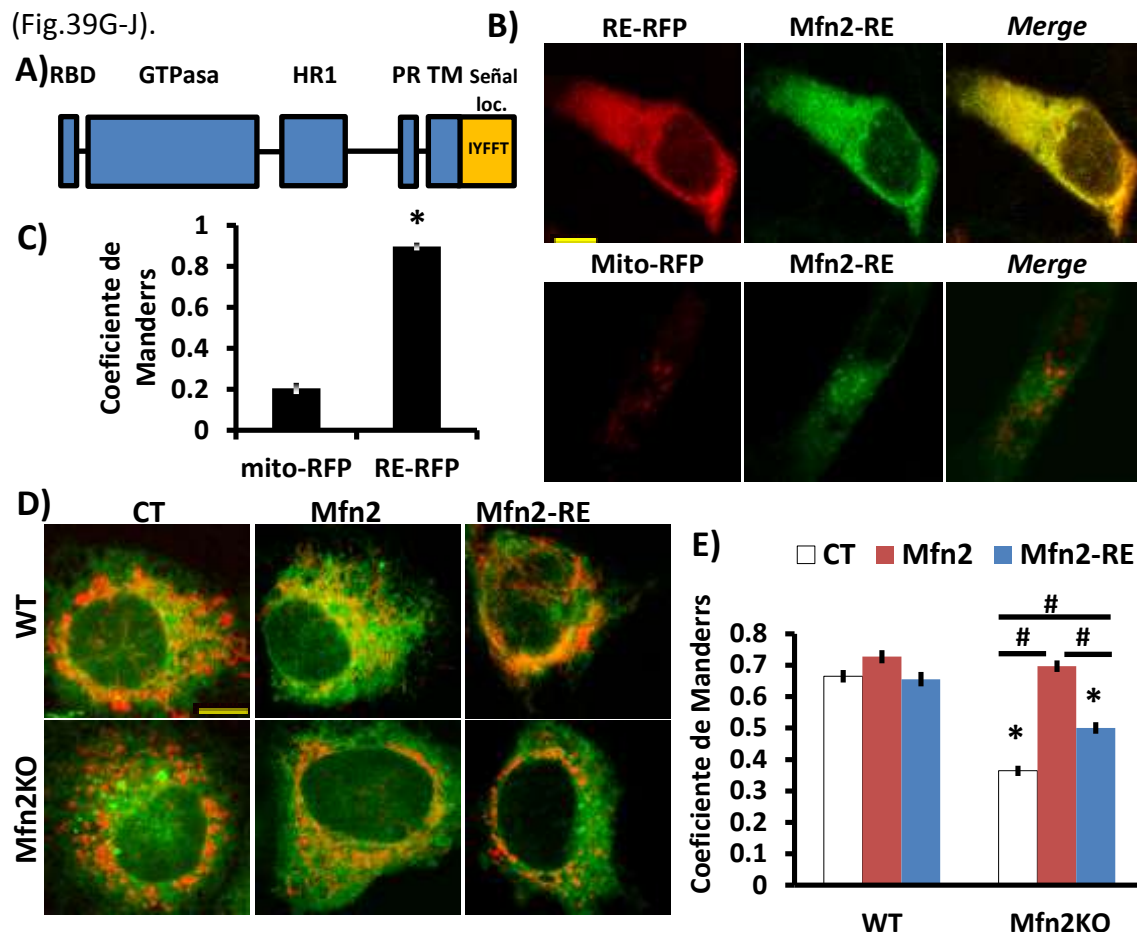
Una vez determinado en el primer bloque de resultados que la función enlazadora de Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial a través de la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias, en este segundo bloque se va a profundizar en el estudio de las interacciones entre mitofusinas.

2.1. La presencia de Mfn2 en el RE activa la bioenergética mitocondrial

La expresión de una forma de Mfn2 dirigida exclusivamente al RE es capaz de restaurar parcialmente las MAMs

Típicamente, se han realizado estudios de interacción entre mitofusinas en el contexto de fusión mitocondrial, siendo propuestos distintos modelos de interacción (Chen et al. 2003; Koshiba et al. 2004; Franco et al. 2016; Mattie et al. 2018). No obstante, en el

contexto de las MAMs, no se conoce demasiado de este mecanismo. Por ejemplo, se ha descrito que el papel enlazador de Mfn2 requiere su presencia en el RE para conformar interacciones homotípicas o heterotípicas con las Mfn2 o Mfn1 localizadas en las mitocondrias, respectivamente (de Brito & Scorrano 2008). Dado que la expresión de Mfn1 no se ve alterada en la línea Mfn2KO (Fig.25A, B), se hipotetizó que la expresión de una forma dirigida de Mfn2 hacia el RE podría reestablecer la bioenergética mitocondrial en la línea Mfn2KO mediante la interacción con la Mfn1 endógena. Esta forma de Mfn2 (Mfn2-RE) está conformada por una secuencia de aminoácidos hidrófobos (IYFFT) en posición C-terminal tras el dominio transmembrana, que dirige a Mfn2 al RE (Rojo et al. 2002) (Fig.39A). Tal y como se esperaba, Mfn2-RE localizaba en el RE y no se detectaba su expresión en las mitocondrias (Fig.39B, C). Interesantemente, aunque la expresión de Mfn2-RE aumentaba los contactos RE-mitocondrias, la recuperación de los mismos no fue total, a diferencia del efecto observado al expresar una forma de Mfn2 *wild-type* (Mfn2) (Fig.39D-F). Por otro lado y de acuerdo a otros estudios (de Brito & Scorrano 2008), la expresión de la forma localizada en el RE, no afectó a la morfología mitocondrial (Fig.39G-J).



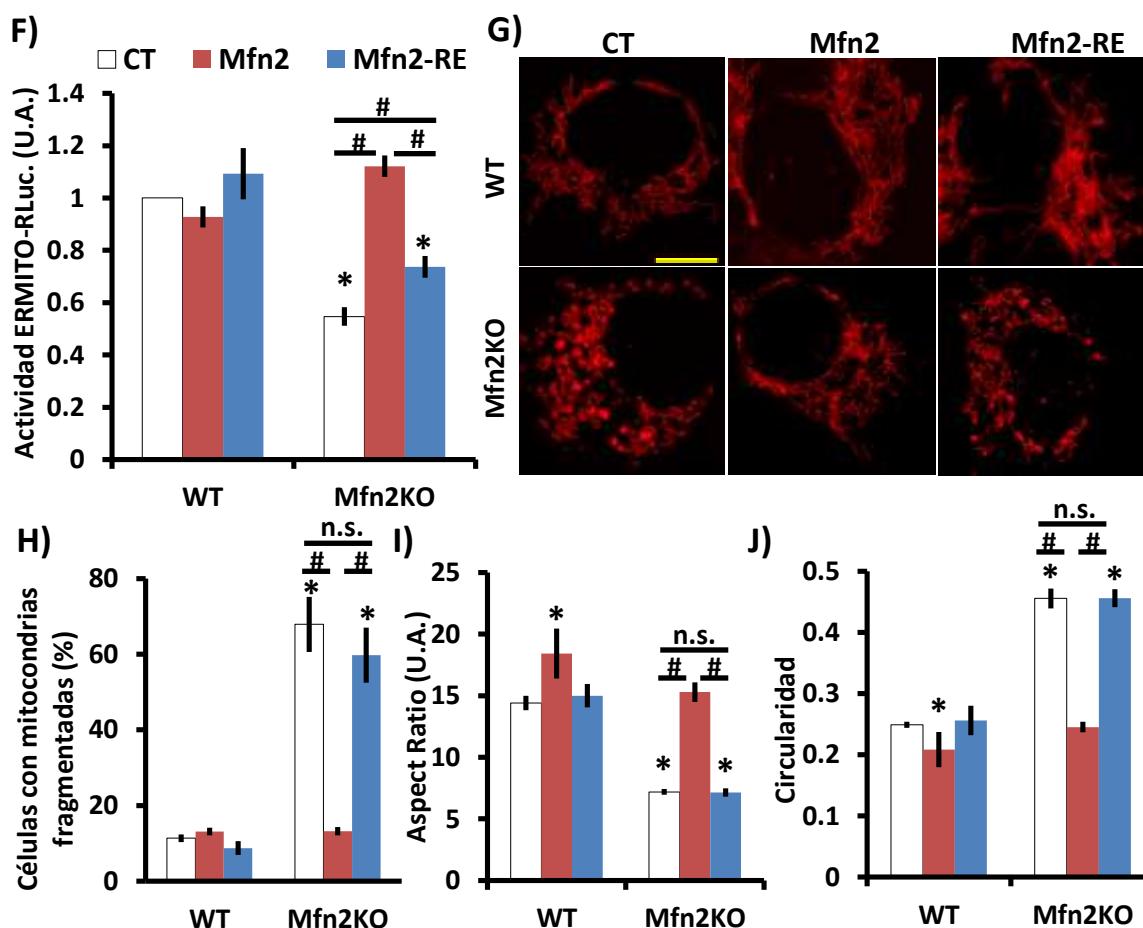


Figura 39: A) Representación esquemática de la forma de Mfn2 dirigida al RE (Mfn2-RE). B) Inmunofluorescencia representativa de fibroblastos DKO co-transfectados con Mfn2-RE y RE-RFP o mito-RFP. C) Análisis de colocalización de Mfn2-RE con RE o mitocondrias mediante el coeficiente de Manders (n=10 células analizadas en 3 experimentos independientes). Barra escala: 5μm. D) Imágenes representativas de células WT y Mfn2KO co-transfectadas con mito-RFP, RE-GFP y Mfn2, Mfn2-RE o plásmido control. Barra de escala: 5μm. E) Después de 48h, las células fueron fijadas y el grado de colocalización entre RE y mitocondrias fue analizado mediante el coeficiente de Manders (n=15 células analizadas en 3 experimentos independientes). F) Se midió la actividad RLuc en células WT y Mfn2KO co-transfectadas con ERMITO-RLuc y Mfn2, Mfn2-RE o plásmido control (n=4 experimentos independientes). G) Imágenes representativas de células WT y DKO co-transfectadas 48h con mito-RFP y los plásmidos indicados. Barra de escala: 5μm. H) Porcentaje de células con mitocondrias globulares (n=310-668 células analizadas en 3 experimentos independientes). I) Análisis del Aspect Ratio calculado como eje mayor/eje menor y (J) circularidad calculada como $4\pi \cdot \text{Area} / \text{Perímetro}^2$ (n=300 mitocondrias en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. #p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05 respecto a su control (n.s.=no significativo).

La expresión de Mfn2-RE es capaz de recuperar parcialmente el intercambio de Ca^{2+} entre el RE y las mitocondrias

Debido a que en resultados anteriores, el restablecimiento de las MAMs se traducía en una recuperación del intercambio de Ca^{2+} entre RE y mitocondrias, se quiso comprobar cómo afectaba el restablecimiento parcial provocado por Mfn2-RE a la homeostasis del Ca^{2+} . Tras analizar el Ca^{2+} mitocondrial y citoplasmático al desacoplar las mitocondrias con CCCP, se observó como la sobreexpresión de Mfn2-RE promovía una mayor salida de Ca^{2+} mitocondrial en comparación con las células Mfn2KO control, pero menor que las cantidades observadas en células WT o Mfn2KO sobreexpresando Mfn2 (Fig.40A, B). Un efecto parecido se mostró en las cantidades de Ca^{2+} del RE, en las cuales hubo una mejora respecto a los niveles de Mfn2KO control, pero parcial, en comparación a los niveles observados en las células WT (Fig.40C). Finalmente, esto se traducía también en una mejora parcial en la transferencia de Ca^{2+} desde el RE hacia las mitocondrias, a diferencia de la expresión de la forma *wild-type* de Mfn2, que promovía una recuperación total (Fig.40D).

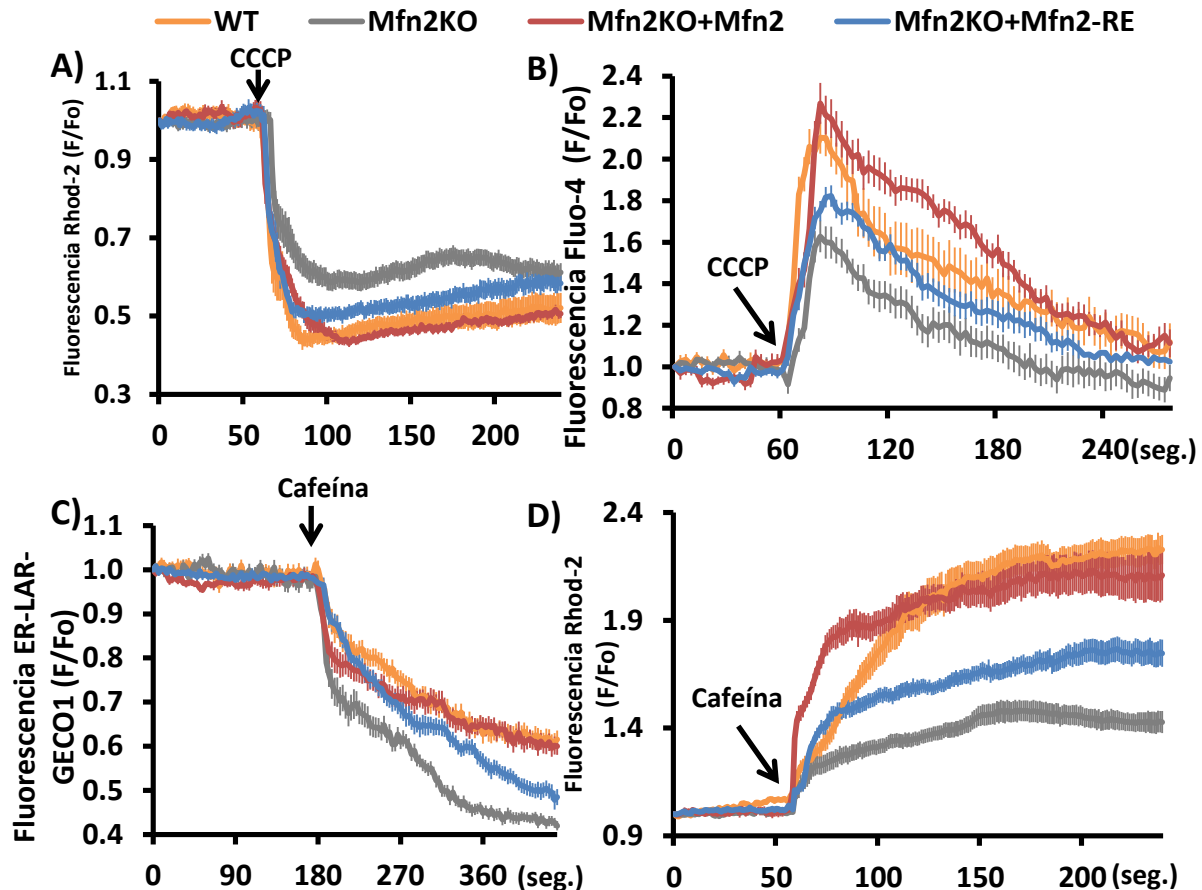
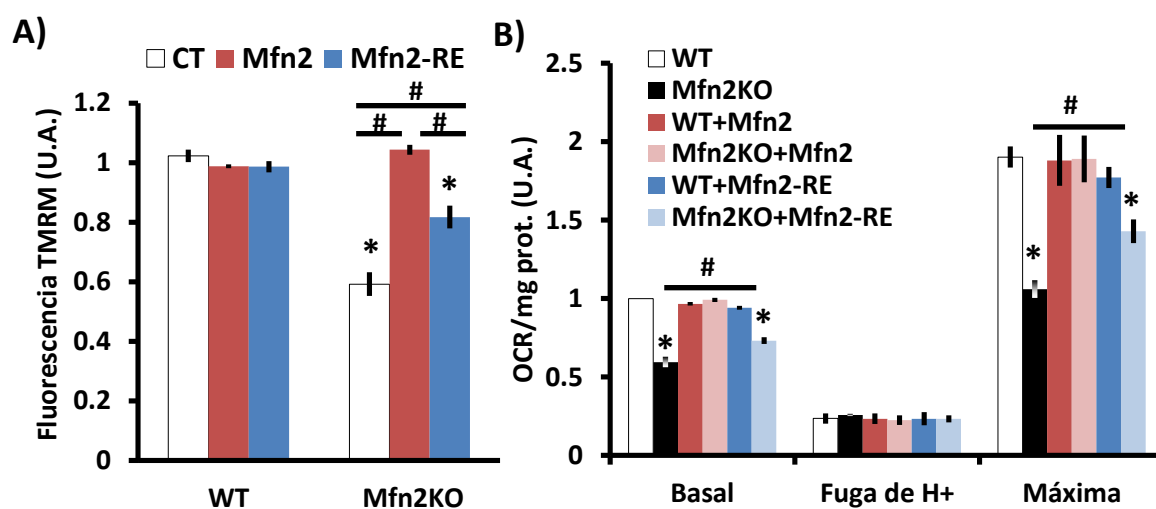


Figura 40: A) Determinación de Ca^{2+} mitocondrial mediante la sonda Rhod-2 ($5\mu\text{M}$) en células WT y Mfn2KO transfectadas con Mfn2, Mfn2-RE o plásmido control. La fluorescencia se midió cada segundo y el Ca^{2+} mitocondrial fue liberado al aplicar CCCP ($10\mu\text{M}$) en el momento indicado ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). B) El Ca^{2+} mitocondrial fue liberado de las mitocondrias aplicando CCCP ($10\mu\text{M}$) y el incremento en el Ca^{2+} citoplasmático fue monitorizado mediante la sonda Fluo-4 ($2\mu\text{M}$) ($n=35$ células analizadas en 4 experimentos independientes). C) El Ca^{2+} del RE fue analizado mediante el sensor genético ER-LAR-GECO. La fluorescencia fue medida cada 3 segundos y el Ca^{2+} fue liberado del RE tratando con cafeína (20mM) en el momento indicado ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). D) El Ca^{2+} mitocondrial fue determinado al liberar el Ca^{2+} del RE a través de los canales RyR aplicando cafeína (20mM) en el momento indicado. La fluorescencia de Rhod-2 ($5\mu\text{M}$) fue medida cada segundo ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p<0,05$, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey.

La expresión de Mfn2-RE es capaz de restablecer parcialmente la bioenergética mitocondrial en un mecanismo dependiente de la transferencia de Ca^{2+}

En consonancia con los resultados anteriores, la valoración del estado bioenergético mitocondrial al sobreexpresar la forma dirigida al RE o la forma *wild-type* de Mfn2, mostraba un restablecimiento parcial o total, respectivamente. Para llegar a estas conclusiones, de nuevo se analizó el MMP (Fig.41A), el perfil de OCR (Fig.41B), los parámetros derivados del mismo (Fig.41C) y el ATP producido por las mitocondrias (Fig.41D). Además, se corroboró la implicación directa de la transferencia de Ca^{2+} en el mecanismo por el cual Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial. La recuperación del MMP y OCR en células Mfn2KO que sobreexpresaban Mfn2 fue abolida bloqueando la salida de Ca^{2+} del RE con los inhibidores del IP_3R (Fig.41E, F) o su captación por las mitocondrias, silenciando la expresión de los canales MCU (Fig.41G, H).



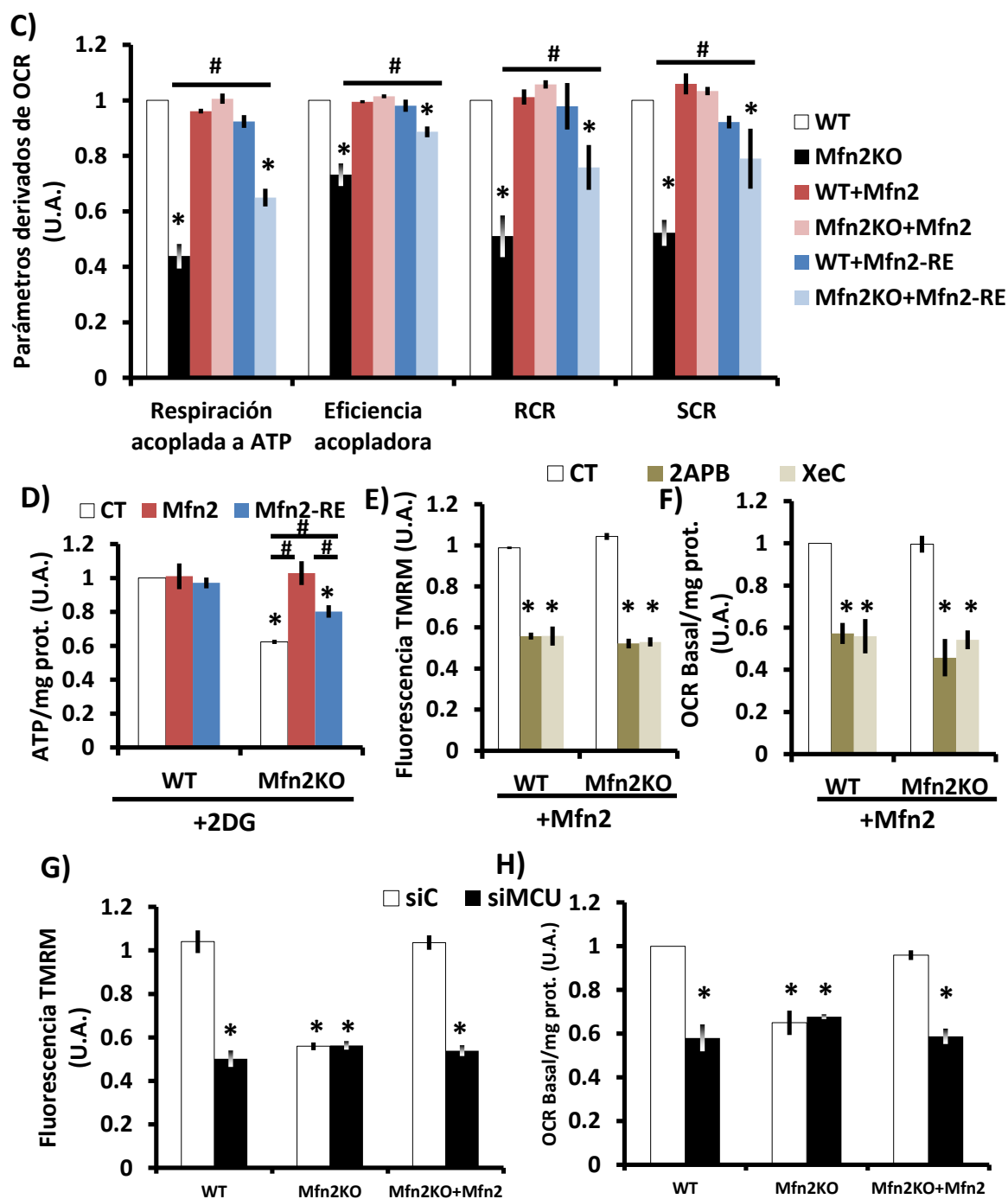


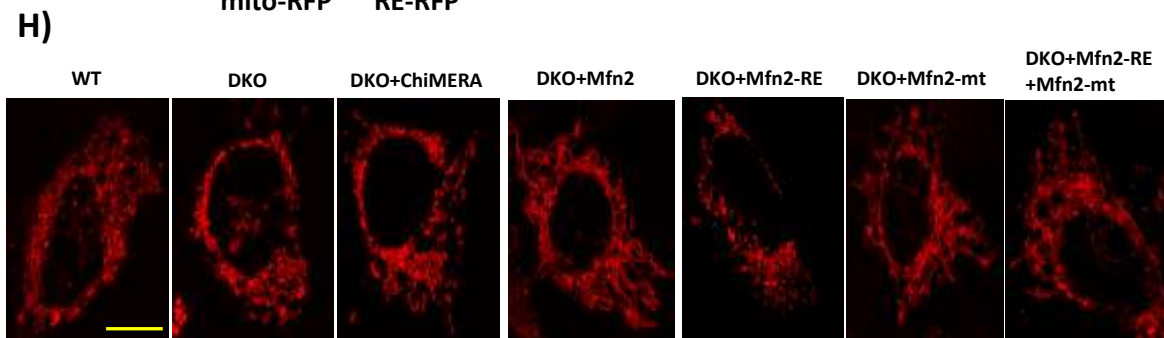
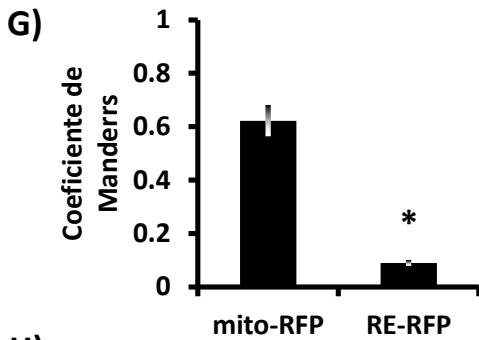
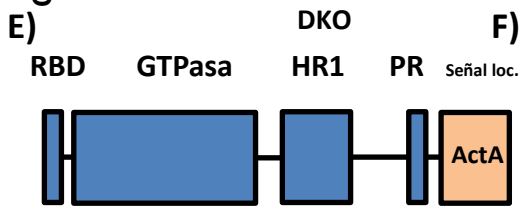
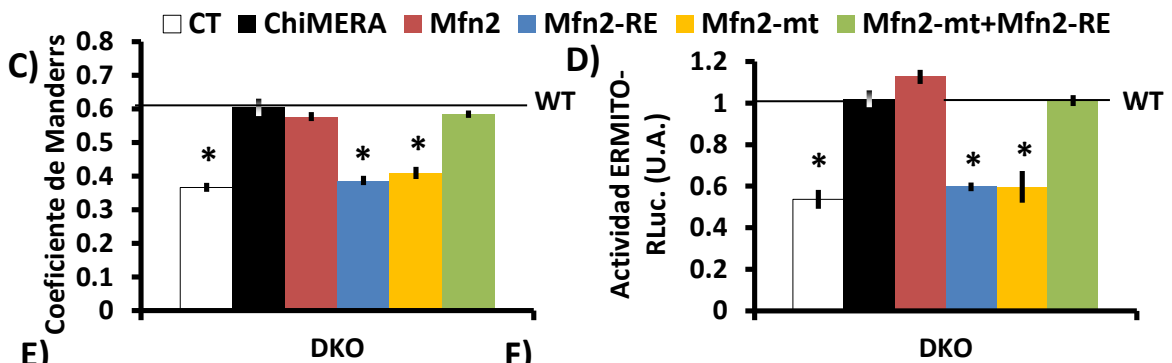
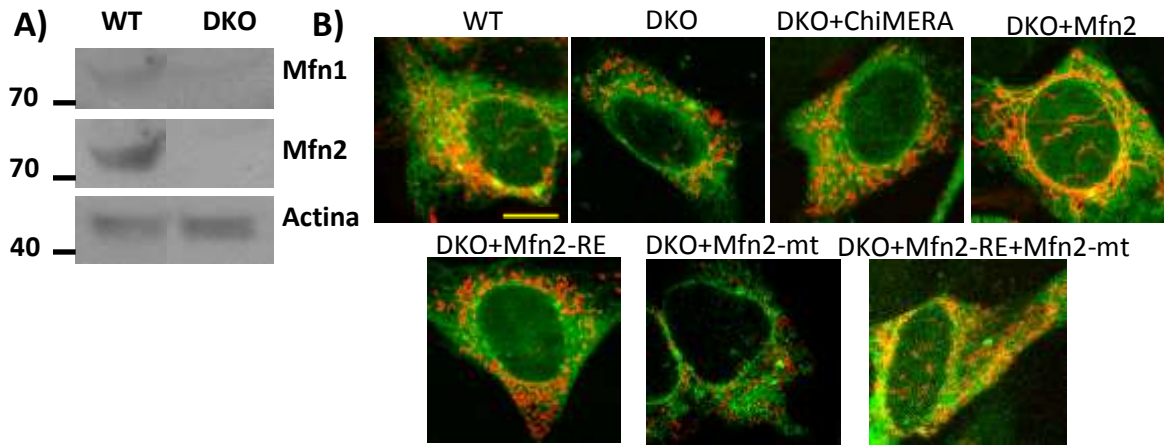
Figura 41: A) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) en células WT y Mfn2KO transfectadas con Mfn2, Mfn2-RE o plásmido control (n=90 células en 3 experimentos independientes). B) El OCR fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra. Para obtener las diferentes medidas se aplicó oligomicina (1 μ M) y CCCP (10 μ M) tal como se describe en el apartado de materiales y métodos (n=5 experimentos independientes). C) Los parámetros derivados del OCR se calcularon de la manera descrita en el apartado de materiales y métodos. D) Los fibroblastos fueron incubados durante 6h con 2DG (10mM) y entonces se midieron los niveles de ATP (n= 3 experimentos independientes). E) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) en células WT y Mfn2KO transfectadas con Mfn2 o plásmido control y tratadas durante 16h con solvente, 2APB (50 μ M) o XeC (1,5 μ M) (n=90 células en 3 experimentos independientes). F) El OCR basal fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra (n = 3 experimentos independientes). G) El MMP se determinó midiendo la

fluorescencia de TMRM (6nM) en células WT y Mfn2KO co-transfectadas con Mfn2 o plásmido control y siC o siMCU (n=90 células en 3 experimentos independientes). F) El OCR basal fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra (n = 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. #p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05 respecto a su control (n.s.=no significativo).

2.2. La interacción homotípica entre mitofusinas es más eficiente que la heterotípica para su función enlazadora en las MAMs

Las uniones Mfn2-Mfn2 son suficientes para reestablecer totalmente las MAMs

Tal y como se ha demostrado anteriormente, la presencia de Mfn2 en el RE es suficiente para restaurar parcialmente las MAMs. No obstante, mediante el uso de una línea celular doble *knockout* para Mfn1 y Mfn2 (Fig.42A), se demostró que este efecto dependía de los contactos establecidos con las Mfn1 mitocondriales endógenas, ya que en esta línea, la cual no expresa tampoco Mfn1, la presencia de Mfn2-RE no mejoró las alteraciones observadas en las MAMs (Fig.42B-D). Con el objetivo de seguir dilucidando el mecanismo de interacción entre mitofusinas en la regulación de la bioenergética mitocondrial, se generó una forma de Mfn2 dirigida únicamente a las mitocondrias. En esta forma de Mfn2 (Mfn2-mt) se ha intercambiado la secuencia C-terminal tras el dominio transmembrana por una secuencia ActA (Fig.42E), péptido de localización mitocondrial (Pistor et al. 1994), permitiendo así su localización exclusivamente en mitocondrias (de Brito & Scorrano 2008), y no en el RE (Fig.42F, G). La expresión solo de Mfn2-mt, a diferencia de Mfn2-RE, consigue normalizar la morfología mitocondrial (Fig.42H-K), pero tampoco tiene efecto en las MAMs (Fig.42B-D). No obstante, si se combina la expresión de Mfn2-RE y Mfn2-mt sí que se restablecen las mismas, del mismo modo que sobreexpresando la forma *wild-type* de Mfn2 o ChiMERA (Fig.42B-D). Interesantemente, a diferencia de la interacción heterotípica, la interacción homotípica sí consiguió un restablecimiento total en las mismas, hecho que sugiere una mayor eficiencia en su función enlazadora.



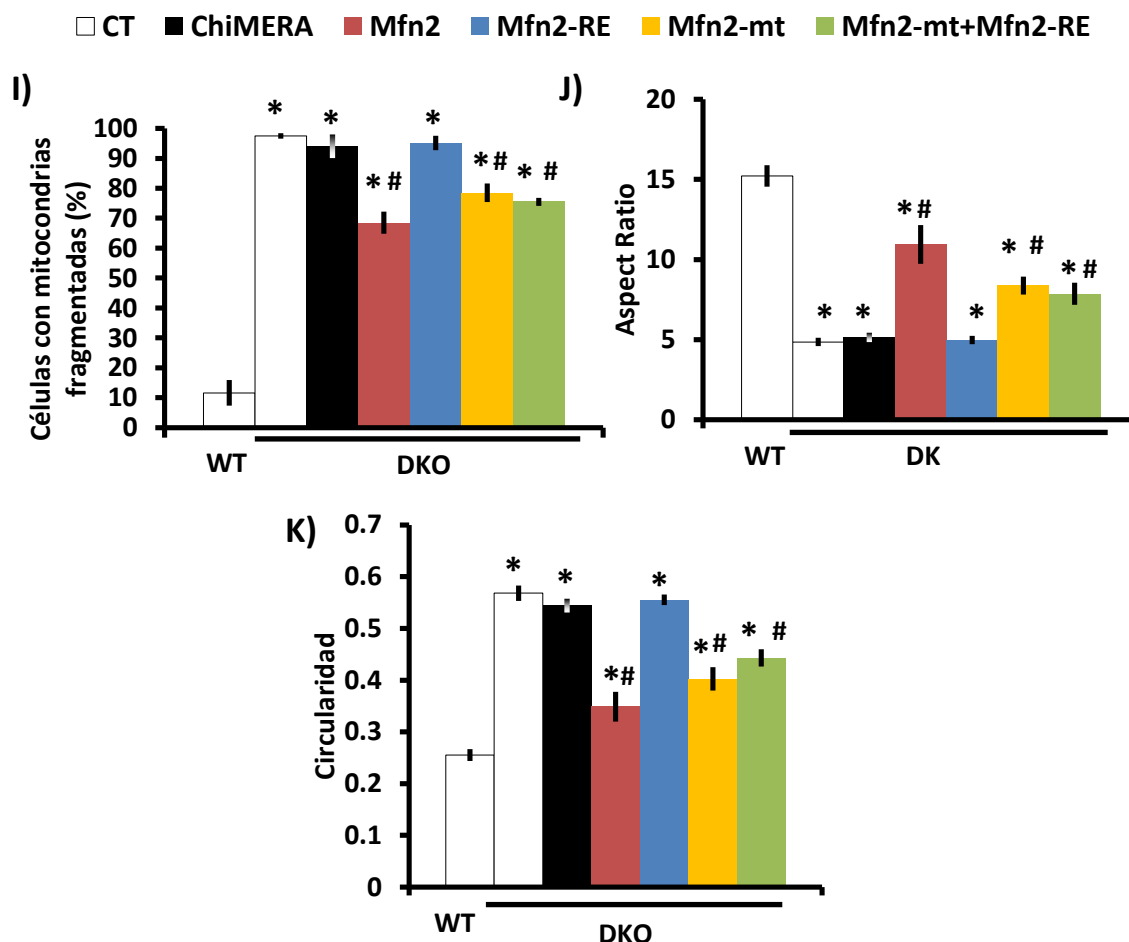
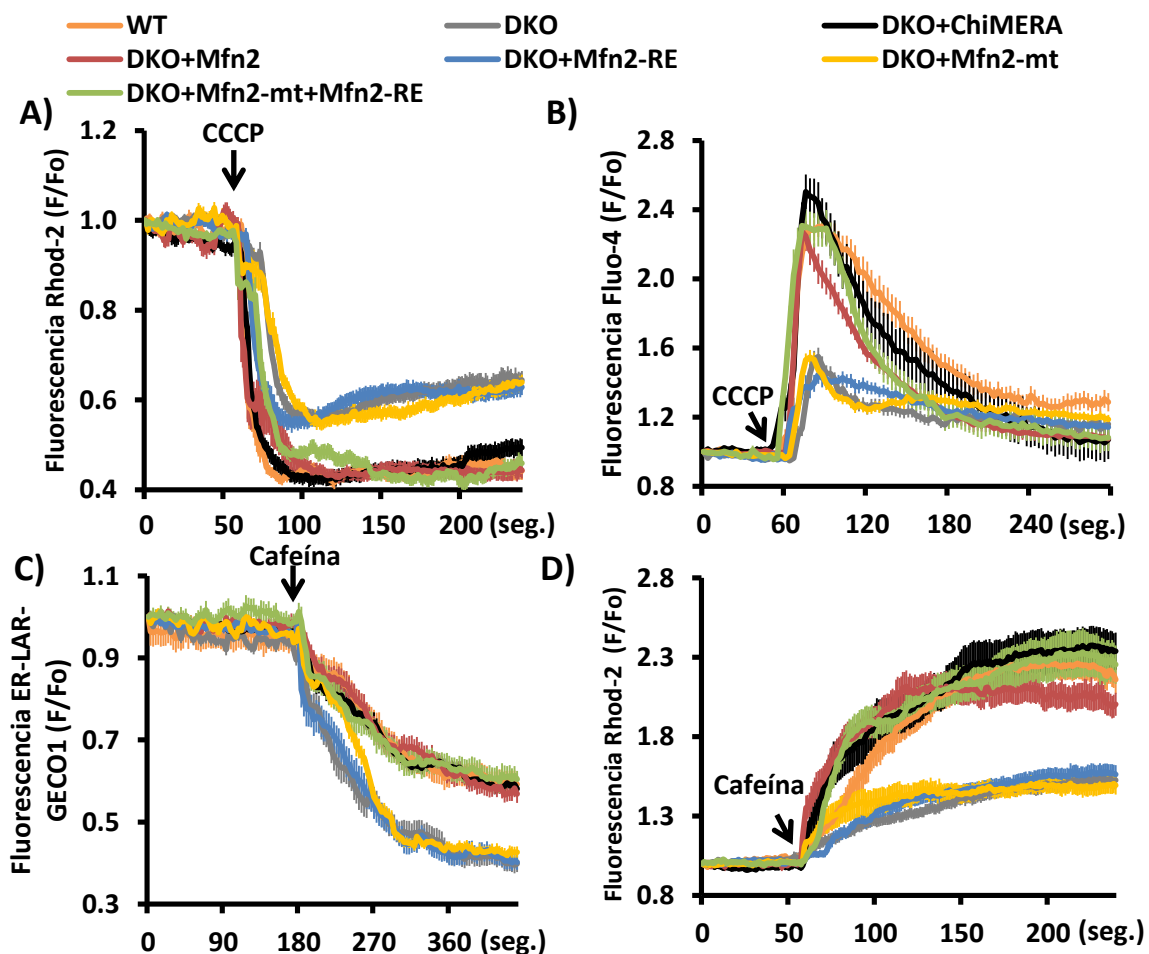


Figura 42: A) *Western Blots* representativos de las proteínas indicadas en fibroblastos WT y DKO. B) Imágenes representativas de células WT y DKO co-transfectadas con mito-RFP, RE-GFP y los plásmidos indicados. Barra de escala: 5 μ m. C) Después de 48h, las células fueron fijadas y el grado de colocalización entre RE y mitocondrias fue analizado mediante el coeficiente de Manders (n=15 células analizadas en 3 experimentos independientes). La línea gris representa WT. D) Se midió la actividad RLuc en células WT y Mfn2KO co-transfectadas con ERMITO-RLuc y los plásmidos indicados (n=4 experimentos independientes). E) Representación esquemática de la forma de Mfn2 dirigida a las mitocondrias (Mfn2-mt). F) Inmunofluorescencia representativa de fibroblastos DKO co-transfectados con Mfn2-mt y RE-RFP o mito-RFP. G) Análisis de colocalización de Mfn2-mt con RE o mitocondrias mediante el coeficiente de Manders (n=10 células analizadas en 3 experimentos independientes). Barra escala: 5 μ m. H) Imágenes representativas de células WT y DKO co-transfectadas 48h con mito-RFP y ChiMERA o plásmido control. Barra de escala: 5 μ m. I) Porcentaje de células con mitocondrias globulares (n=175-408 células analizadas en 3 experimentos independientes). J) Análisis del Aspect Ratio calculado como eje mayor/eje menor y (K) circularidad calculada como $4\pi \cdot \text{Area} / \text{Perímetro}^2$ (n=300 mitocondrias en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. *p<0,05 respecto WT, #p<0,05 respecto DKO, ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey.

Las uniones Mfn2-Mfn2 permiten restablecer totalmente la homeostasis del Ca^{2+} y la bioenergética mitocondrial

De acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior, la expresión exclusiva de Mfn2-RE o Mfn2-mt en la línea DKO no presentaba ningún efecto en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial (Fig.43A, B), del RE (Fig.43C) o en la transferencia de Ca^{2+} entre ambos orgánulos (Fig.43D). Por su parte, la expresión combinada de Mfn2-RE con Mfn2-mt, Mfn2 *wild-type* o ChiMERA, conseguía restablecer de manera total la homeostasis de Ca^{2+} a niveles equiparables a los observados en la línea WT (Fig.43A-D). Por último, se determinaron los distintos parámetros que definen el estado bioenergético mitocondrial y de nuevo solo se observaron mejorías cuando las dos formas dirigidas eran expresadas de manera combinada, o cuando se expresaba Mfn2 *wild-type* o ChiMERA (Fig.43E-H). Todos estos resultados indican que se requiere la presencia de Mfn2 en el RE para establecer interacciones con las mitofusinas mitocondriales de manera homotípica o heterotípica, y que estas interacciones son necesarias para regular la bioenergética mitocondrial a través del intercambio de Ca^{2+} .



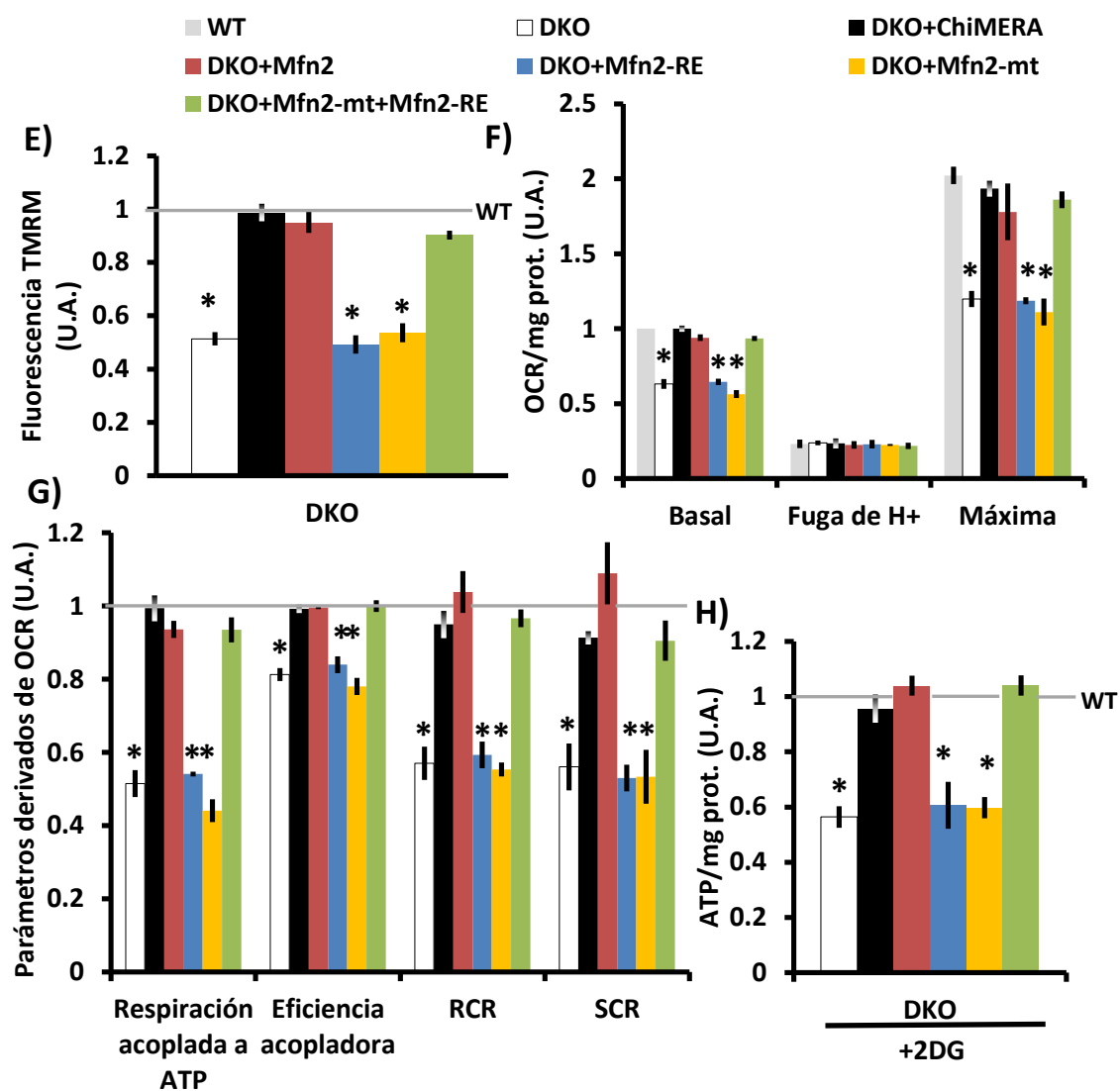


Figura 43: A) Determinación de Ca^{2+} mitocondrial mediante la sonda Rhod-2 ($5\mu\text{M}$) en células WT y DKO transfectadas con los plásmidos indicados. La fluorescencia se midió cada segundo y el Ca^{2+} mitocondrial fue liberado al aplicar CCCP ($10\mu\text{M}$) en el momento indicado ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). B) El Ca^{2+} mitocondrial fue liberado de las mitocondrias aplicando CCCP ($10\mu\text{M}$) y el incremento en el Ca^{2+} citoplasmático fue monitorizado mediante la sonda Fluo-4 ($2\mu\text{M}$) ($n=25-27$ células analizadas en 3 experimentos independientes). C) El Ca^{2+} del RE fue analizado mediante el sensor genético ER-LAR-GECO. La fluorescencia fue medida cada 3 segundos y el Ca^{2+} fue liberado del RE tratando con cafeína (20mM) en el momento indicado ($n=30$ células analizadas en 3 experimentos independientes). D) El Ca^{2+} mitocondrial fue determinado al liberar el Ca^{2+} del RE a través de los canales RyR aplicando cafeína (20mM) en el momento indicado. La fluorescencia de Rhod-2 ($5\mu\text{M}$) fue medida cada segundo ($n=25$ células analizadas en 3 experimentos independientes). E) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) en células WT y DKO transfectadas con los plásmidos indicados ($n=90$ células en 3 experimentos independientes). La línea gris representa WT. F) El OCR fue normalizado por la cantidad de proteína de cada muestra. Para obtener las diferentes medidas se aplicó oligomicina ($1\mu\text{M}$) y CCCP ($10\mu\text{M}$) tal como se describe en el apartado de materiales y métodos ($n=3$ experimentos independientes). G) Los parámetros derivados del OCR se calcularon de la manera descrita en el apartado de materiales y métodos. H) Los fibroblastos fueron incubados durante 6h con 2DG (10mM) y entonces se midieron los niveles de ATP ($n=3$ experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p<0,05$, ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey.

Por otro lado, cabe destacar que las alteraciones observadas en la condición control de la línea DKO son equiparables a las de la línea Mfn2KO, tanto a nivel de MAMs, como de homeostasis de Ca^{2+} o bioenergética mitocondrial. Así pues, no se observa un incremento añadido por el hecho de que falten las dos mitofusinas, en vez de únicamente Mfn2.

Las interacciones heterotípicas también rescatan parcialmente las MAMs y el MMP en el modelo doble knockout para Mfn1 y Mfn2

Los resultados anteriores muestran como sobreexpresando Mfn2-RE en células Mfn2KO, su interacción con Mfn1 endógenas permite una recuperación parcial en las MAMs, homeostasis del Ca^{2+} y bioenergética mitocondrial. No obstante, si se sobreexpresa junto con la forma Mfn2-mt en células DKO, la recuperación es total. Este hecho podría ser consecuencia de la sobreexpresión de Mfn2-mt y no de las características propias de las interacciones entre Mfn1 y Mfn2. Para descartar esta posibilidad, se sobreexpresó Mfn2-RE junto con Mfn1 en células DKO y, efectivamente, también apareció una recuperación parcial de los contactos RE-mitocondria (Fig.44A-C). Como indicador del estado bioenergético mitocondrial se

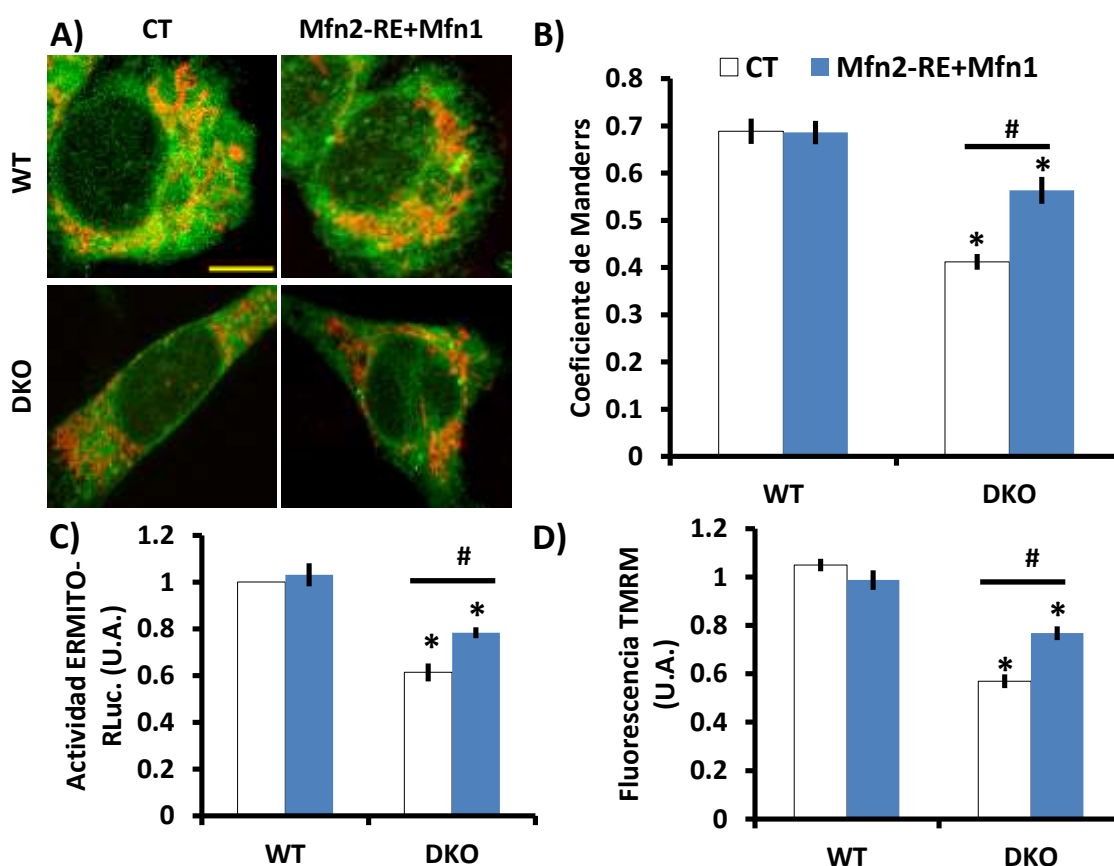


Figura 44: A) Imágenes representativas de células WT y DKO co-transfectadas con mito-RFP, RE-GFP y los plásmidos indicados. Barra de escala: 5µm. B) Después de 48h, las células fueron fijadas y el grado de colocalización entre RE y mitocondrias fue analizado mediante el coeficiente de Manders (n=15 células analizadas en 3 experimentos independientes). C) Se midió la actividad RLuc en células WT y Mfn2KO co-transfectadas con ERMITO-RLuc y los plásmidos indicados (n=3 experimentos independientes). D) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) (n=90 células en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media ± SEM. #p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05 respecto a su control.

analizó el MMP, el cual también se vio mejorado, pero solo parcialmente (Fig.44D). Por lo tanto, de este modo se corroboró que las interacciones heterotípicas son menos efectivas que las homotípicas regulando las MAMs y la bioenergética mitocondrial, y se descartó un posible efecto de la sobreexpresión de las mitofusinas en los resultados observados anteriormente.

2.3. La localización de Mfn1 en el RE no permite restaurar las alteraciones en la bioenergética mitocondrial causadas por la falta de Mfn2

La interacción Mfn1-Mfn1 no restablece las MAMs ni la bioenergética mitocondrial en células Mfn2KO

Hasta el día de hoy, aunque se ha descrito múltiples veces las implicaciones de Mfn2 en distintos procesos relacionados con las MAMs, y específicamente con el RE a causa de su presencia en el mismo, no hay ninguna evidencia de la presencia de Mfn1 en este orgánulo (Yu et al. 2021; Smith 2021; Leal & Martins 2021). Con el fin de seguir dilucidando el mecanismo de interacción entre mitofusinas en las MAMs, se diseñó una Mfn1 que se dirige únicamente al RE, en vez de a las mitocondrias como ocurre de manera natural. Para ello, se empalmó la secuencia N-terminal de Mfn1 justo delante del dominio transmembrana de Mfn2 seguido por una secuencia de aminoácidos hidrófobos (IYFFT) (Fig.45A), como ocurre en Mfn2-RE. Mediante inmunofluorescencia y posterior análisis del coeficiente de Manders se pudo determinar que esta forma de Mfn1 (Mfn1-RE) localizaba efectivamente en el RE, y no en las mitocondrias (Fig.45B, C). Una vez determinada su correcta localización, se decidió sobreexpresar Mfn1-RE en la línea Mfn2KO, la cual dispone de manera natural de Mfn1 en las mitocondrias, para así promover la interacción homotípica entre mitofusinas 1. Al analizar los contactos

RE-mitocondrias en presencia de este tipo de interacciones, se observó que tanto mediante el análisis del coeficiente de Manders (Fig.45D, E) como mediante el uso de ERMITO-RLuc (Fig.45F), este tipo de interacción no tiene ningún efecto enlazador en los mismos. Además, como medida indicadora del estado bioenergético mitocondrial, se determinó el MMP, y de nuevo no se observó ninguna mejoría al promover las interacciones homotípicas Mfn1-Mfn1 (Fig.45G).

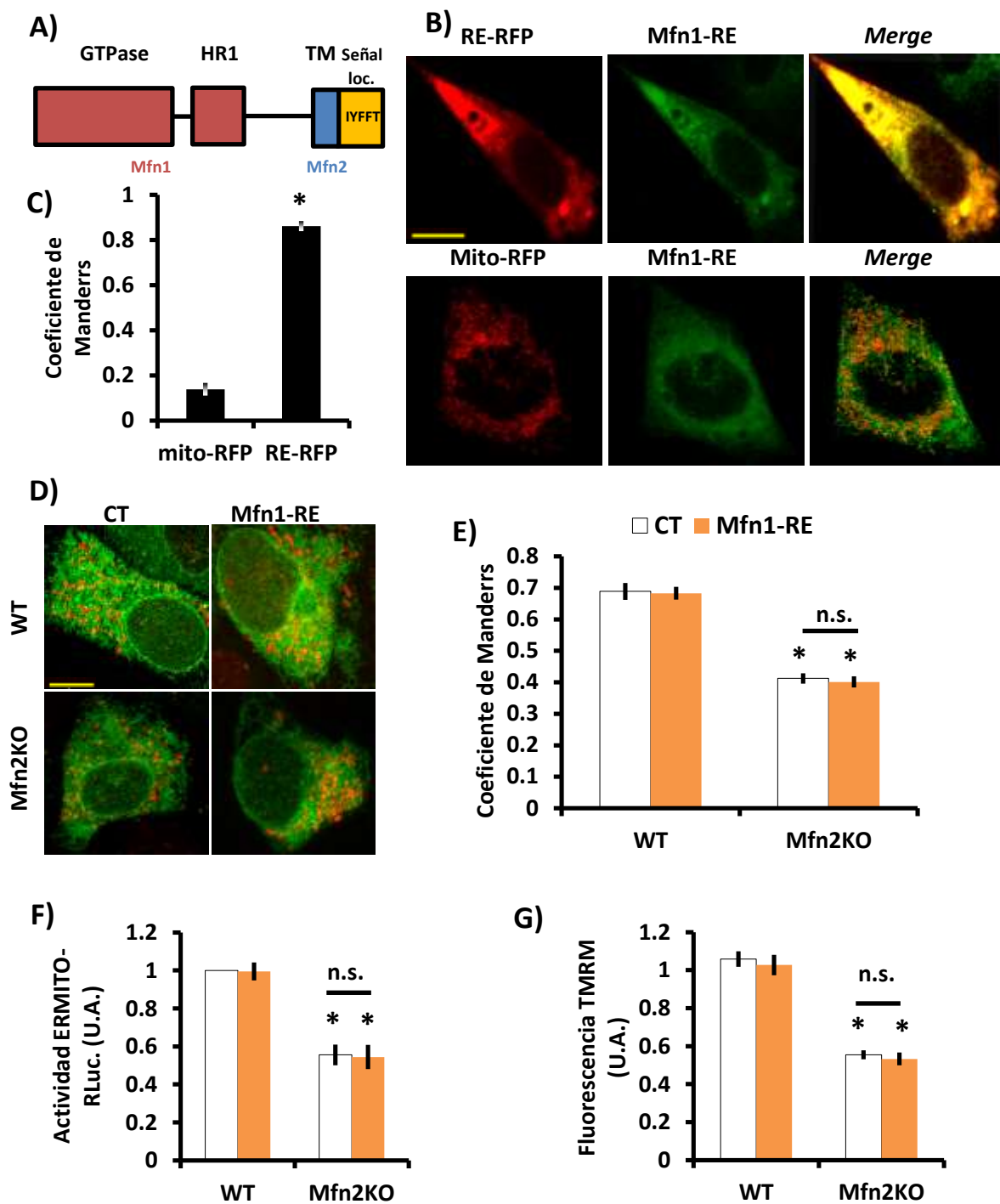
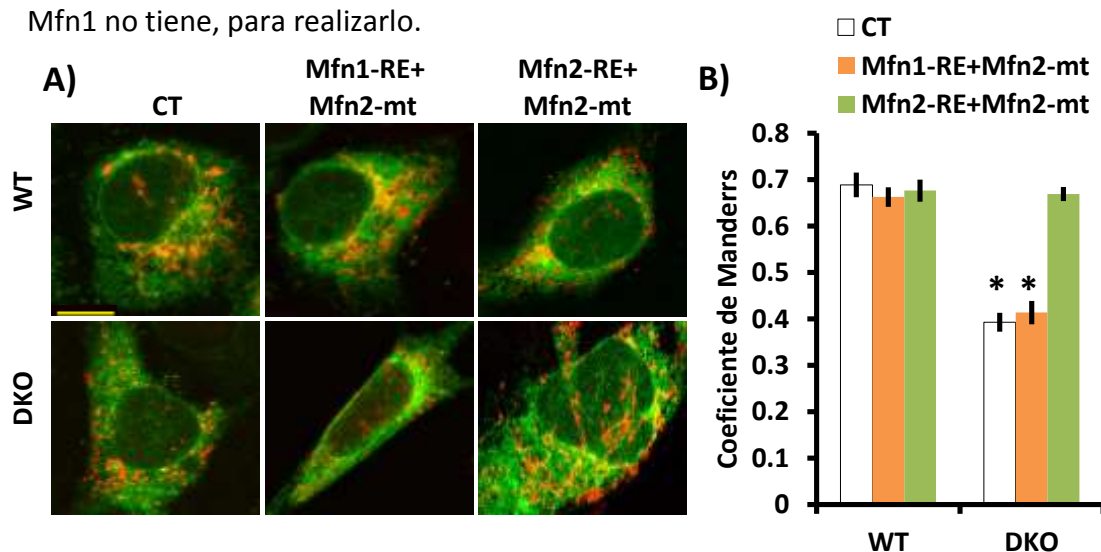


Figura 45: A) Representación esquemática de la forma de Mfn1 dirigida al RE (Mfn1-RE). B) Inmunofluorescencia representativa de fibroblastos DKO co-transfectados con Mfn1-RE y RE-RFP o mito-RFP. Barra escala: 5µm). C) Análisis de colocalización de Mfn1-RE con RE o mitocondrias mediante el coeficiente de Manders (n=10 células analizadas en 3 experimentos independientes). D) Imágenes representativas de células WT y Mfn2KO co-transfectadas con mito-RFP, RE-GFP y Mfn1-RE o plásmido control. Barra de escala: 5µm. E) Después de 48h, las células fueron fijadas y el grado de colocalización entre RE y mitocondrias fue analizado mediante el coeficiente de Manders (n=15 células analizadas en 3 experimentos independientes). F) Se midió la actividad RLuc en células WT y Mfn2KO co-transfectadas con ERMITO-RLuc y Mfn1-RE o plásmido control (n=3 experimentos independientes). G) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) (n=90 células en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. *p<0,05, prueba t de Student o ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey (n.s.= no significativo).

La interacción entre Mfn1 del RE y Mfn2 mitocondriales tampoco permite recuperar las MAMs ni la bioenergética mitocondrial

En vista de que la interacción homotípica entre Mfn1 no es capaz de promover la unión entre mitocondrias y RE, se decidió sobreexpresar la proteína Mfn1-ER en la línea DKO, juntamente con la forma dirigida a mitocondrias de Mfn2 (Mfn2-mt). De este modo, se genera una nueva combinación de interacción entre mitofusinas no estudiada aún hasta ahora, es decir, Mfn1 localizada en RE con Mfn2 localizada en mitocondrias. No obstante, de nuevo este tipo de interacción fracasó en el intento de reestablecer los contactos RE-mitocondrias (Fig.46A-C) o el MMP (Fig.46D), ni siquiera parcialmente. Por lo tanto, estos resultados sugieren que únicamente Mfn2 es capaz de regular la bioenergética mitocondrial a través de su función enlazadora cuando se encuentra en las MAMs del RE, y que debe poseer una característica distintiva que Mfn1 no tiene, para realizarlo.



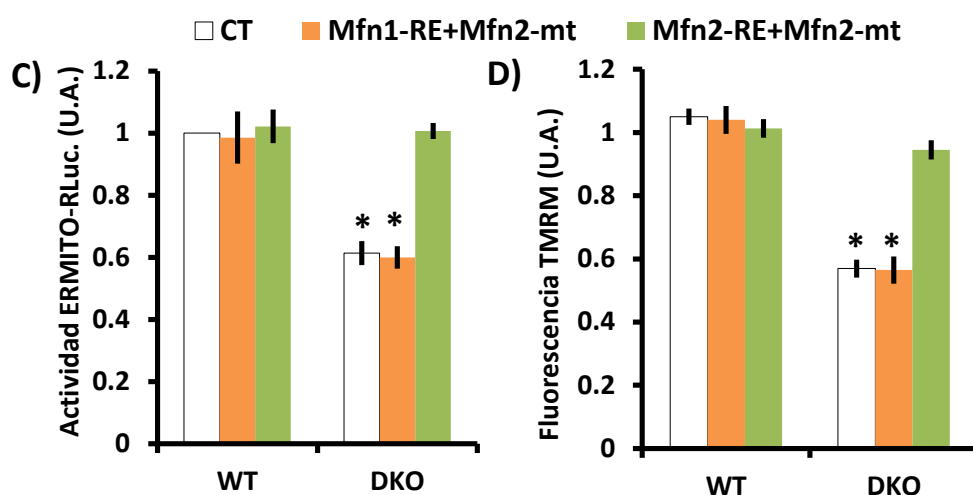


Figura 46: A) Imágenes representativas de células WT y Mfn2KO co-transfectadas con mito-RFP, RE-GFP y los plásmidos indicados. Barra de escala: 5 μ m. B) Después de 48h, las células fueron fijadas y el grado de colocalización entre RE y mitocondrias fue analizado mediante el coeficiente de Manders (n=15 células analizadas en 3 experimentos independientes). C) Se midió la actividad RLuc en células WT y Mfn2KO co-transfectadas con ERMITO-RLuc y los plásmidos indicados (n=3 experimentos independientes). D) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) (n=90 células en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. *p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey.

2.4. La expresión de mitofusinas incompletas, con dominios combinados o mutaciones no es efectiva en la recuperación bioenergética de células Mfn2KO

Ni el dominio HR1 ni el dominio de unión a Ras parecen ser determinantes para que Mfn2 restablezca de manera exclusiva el MMP

Los resultados anteriores mostraron que debe ser Mfn2 la proteína que específicamente localice en el RE con tal de promover las uniones entre ambos orgánulos. Este hecho sugiere que Mfn2 debe poseer alguna característica diferencial a Mfn1 que permite realizar esta función. Por ejemplo, Mfn2 posee un dominio RBD (Chen et al. 2004) y una región rica en prolinas (Zorzano et al. 2010) que no están presentes en Mfn1. Con el objetivo de profundizar aún más en el mecanismo de interacción entre las mitofusinas en su regulación de la bioenergética mitocondrial e intentar averiguar por qué específicamente Mfn2 es quien lo promueve, se generó una serie de mitofusinas que poseían una combinación de dominios de ambas mitofusinas (Fig.47A). En los resultados anteriores, el MMP correlacionaba fielmente con los

contactos RE-mitocondria y el intercambio de Ca^{2+} , por lo que se usaron las medidas de MMP como aproximación inicial para estudiar los contactos RE-mitocondria.

Ya hace años se determinó que el dominio transmembrana era fundamental para el direccionamiento de Mfn2 a las mitocondrias (Santel & Fuller 2001; Rojo et al. 2002). Por lo tanto, se decidió empezar por unas mitofusinas que poseen los dominios transmembranas (TM) y regiones C-terminales cambiados, por si éstos también eran determinantes en su direccionamiento al RE, mecanismo que aún se sigue sin conocer, y posterior regulación de las MAMs. En este ensayo se observó, que Mfn1 con el dominio TM de Mfn2 (Mfn1-TM2) no recuperaba la bioenergética mitocondrial (Fig.47B), tal y como se esperaba por los experimentos realizados con Mfn1-RE. De manera interesante, tampoco se observaba ningún efecto cuando se hacía el intercambio en viceversa, por lo que si Mfn2 adopta el dominio TM de Mfn1 (Mfn2-TM1) pierde su capacidad de recuperar la bioenergética mitocondrial en células Mfn2KO (Fig.47B). Este hecho puede indicar que el dominio TM es importante en la localización de Mfn2 al RE y posterior regulación de las MAMs.

Otros estudios han demostrado que formas de Mfn2 sin el dominio RBD, o con mutaciones puntuales en el mismo, son incapaces de regular la morfología reticular o los contactos RE-mitocondria, a pesar de mantener sus capacidades de fusión mitocondrial (de Brito & Scorrano 2008; Martins De Brito & Scorrano 2009). Pensando en que este hecho podría ser la característica distintiva entre ambas mitofusinas que provoca que Mfn2, pero no Mfn1, regule la bioenergética mitocondrial, se añadió este dominio en la estructura de la Mfn1 (Mfn1-Ras2), pero tampoco se obtuvo ninguna mejoría en la bioenergética mitocondrial (Fig.47C). Dado que el dominio TM parece ser necesario en Mfn2 para regular la bioenergética mitocondrial, pero no por sí solo, se decidió generar una Mfn1 con el dominio TM de Mfn2 y con su RBD (Mfn1-TM2Ras2), por si están implicados de manera combinada el direccionamiento a RE y la presencia de RBD. De nuevo, tampoco se producía ninguna mejoría en el MMP (Fig.47C), por lo que la combinación de estos dos dominios tampoco parece ser la característica distintiva.

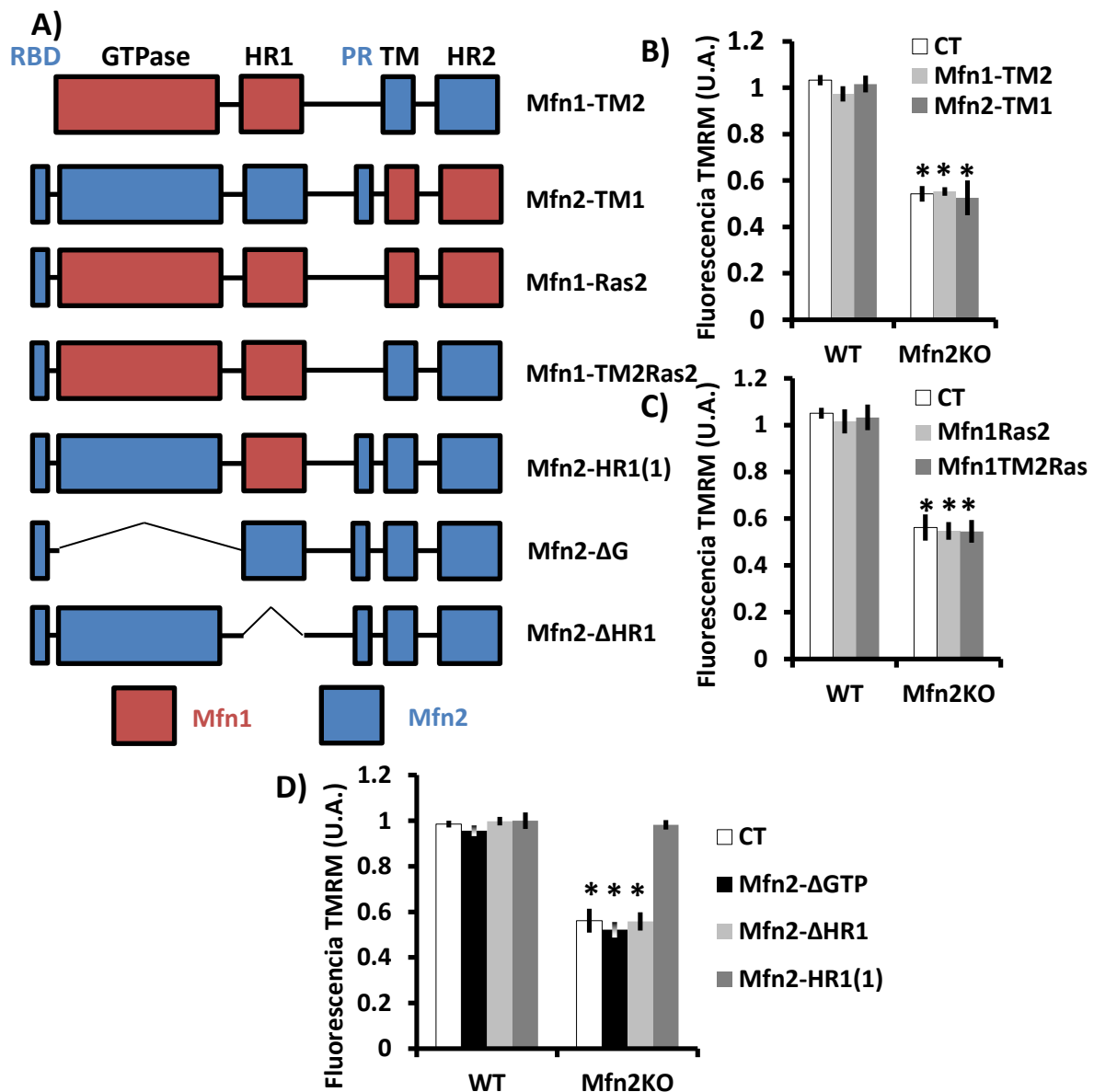


Figura 47: A) Representaciones esquemáticas de las formas de Mfn1 y Mfn2 con dominios intercambiados o sin alguno de ellos. B-D) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) en fibroblastos WT y Mfn2KO transfectados con las formas indicadas (n=90 células en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey.

Desde su descubrimiento, se acepta un modelo en el cual las mitofusinas presentan todos sus dominios, menos el transmembrana, encarados hacia el citosol, siendo el dominio HR2 el encargado de las interacciones entre mitofusinas (Chen et al. 2003; Koshiba et al. 2004). No obstante, con el paso de los años se han ido proponiendo distintos modelos de interacción entre mitofusinas, en los cuales se da mayor importancia a los dominios GTPasa y HR1, o que sugieren nuevas topologías (Huang et al. 2011; Franco et al. 2016; Qi et al. 2016; Cao et al. 2017; Mattie et al. 2018; Cohen & Tareste 2018). Sea o no el dominio GTPasa el encargado de mediar físicamente las

interacciones entre mitofusinas, algo en lo que concuerdan todos los modelos anteriores es la importancia de este dominio en el mecanismo, por ejemplo promoviendo las interacciones mediante las hidrólisis de GTP durante la fusión mitocondrial. La importancia de este dominio queda patente en el uso de una Mfn2 la cual no tiene dominio GTPasa (Mfn2- Δ G) (Rojo et al. 2002), y que no permitía la recuperación de los defectos bioenergéticos de las células Mfn2KO (Fig.47D). Por otro lado, el dominio HR1 está altamente conservado entre diferentes especies como la levadura, *Drosophila* o los humanos (Basso et al. 2018). Además, se ha descrito que la ubiquitinización de la lisina 416 de Mfn2, la cual localiza en el dominio HR1, permite un control de los contactos físicos RE-mitocondrias (Basso et al. 2018). La eliminación de HR1 en Mfn2 abolió la recuperación de la bioenergética mitocondrial en células Mfn2KO (Fig.47D), por lo que este dominio parece ser importante en la regulación de la bioenergética por Mfn2. Con tal de comprobar si HR1 confiere la exclusividad que permite regular la bioenergética mitocondrial, se decidió sustituir el dominio HR1 de Mfn2 por el de Mfn1 (Mfn2-HR1(1)), y esta vez sí que se observó una recuperación en el MMP (Fig.47B). Este hecho indica que el dominio HR1 de Mfn2 tampoco parece ser la clave para que ésta realice su función bioenergética, ya que si el dominio HR1 pertenece a Mfn1, no afecta negativamente a la misma.

Estos resultados sugieren que aunque el dominio TM debe ser importante para la localización en el RE, pero se necesitan otros dominios para establecer los contactos. Además, ni el RBD ni el dominio HR1 parecen ser las características distintivas que permiten a Mfn2 promover el mecanismo de regulación de la bioenergética mitocondrial a través de su función enlazadora. No obstante, estos son unos datos muy preliminares que deberían ser completados con un estudio más profundo de las distintas formas para poder sacar conclusiones con mayor solidez, como por ejemplo mediante la determinación de su localización en RE o mitocondrias, o con la generación de nuevas combinaciones.

El dominio HR1 podría estar relacionado con la estabilización de las interacciones entre mitofusinas, reforzando así su función bioenergética

Típicamente se ha relacionado la función enlazadora de Mfn2 en las MAMs con su presencia en ambos orgánulos (de Brito & Scorrano 2008), hecho que va en consonancia con los resultados mostrados anteriormente en esta tesis. Dado que en este trabajo también se ha mostrado una estrecha correlación entre la regulación de los contactos RE-mitocondrias por Mfn2 y la bioenergética mitocondrial, sorprende que una forma de Mfn2 sin dominio TM ni HR2 (Mfn2- Δ TM Δ HR2) (Fig.48A), que localiza mayoritariamente en el citosol, sea capaz de estimular el metabolismo mitocondrial en células musculares y hepáticas (Segalés et al. 2013).

Con tal de determinar cómo podría estar actuando esta forma citoplasmática y cómo podría encajar en el mecanismo propuesto anteriormente, se sobreexpresó en las células WT y Mfn2KO. La sobreexpresión de esta forma mayoritariamente citosólica en células Mfn2KO no producía ninguna mejoría en el MMP, pero provocaba un aumento significativo en las células WT (Fig.48B), tal y como ya está descrito (Segalés et al. 2013). Este es un hecho remarcable ya que hasta ahora, ninguna de las proteínas ni formas de mitofusina sobreexpresadas en células WT había producido un incremento aún mayor a los valores normales. Siguiendo en esta línea, se pensó que el dominio HR1 de esta forma citosólica podría estar propiciando la estabilización de contactos mediante la interacción con los dominios HR1 o HR2 de las mitofusinas endógenas presentes en las células WT. Para verificarlo, se generó una construcción para expresar únicamente el dominio HR1 de Mfn2 (HR1). Al sobreexpresar este dominio, de nuevo se observó un aumento en el MMP de las células WT (Fig.48C). De cara a una posible futura aplicación terapéutica, se quiso comprobar si era necesario todo el dominio *coiled-coil*, o solo una parte del mismo es suficiente para promover la estabilización de las interacciones. Por este motivo, se generó una versión corta del dominio HR1 (HR1c), la cual contenía únicamente 24 aminoácidos. Efectivamente, se corroboró como este péptido, aunque permitía un aumento del MMP ligeramente inferior al dominio HR1 entero, éste era significativamente superior al de las células WT control (Fig.48C).

Parece claro que el efecto tanto de la forma de Mfn2 citosólica como del dominio HR1 (o su versión corta) solo es visible cuando están presentes mitofusinas endógenas. Este hecho reforzó la idea de que su carácter estabilizador confiriera más robustez en las interacciones entre mitofusinas y que se tradujera también en una mayor estimulación de la bioenergética mitocondrial. Como las interacciones heterotípicas generaban una recuperación parcial tanto en la distancia de los contactos RE-mitocondrias como en la homeostasis del Ca^{2+} o la propia bioenergética mitocondrial (Fig.39-41), se decidió co-expresar en células Mfn2KO la forma citosólica de Mfn2 junto la forma dirigida al RE y verificar si podría estar actuando mediante un mecanismo que confiriera mayor robustez a las interacciones presentes. Efectivamente, la co-expresión de ambas formas permite una recuperación total del MMP en células Mfn2KO, en detrimento del efecto parcial que se observa solo expresando Mfn2-RE o del efecto nulo que genera Mfn2- $\Delta\text{TM}\Delta\text{HR2}$ en esta línea celular (Fig.48D). Este fenómeno también se observa cuando se co-expresa Mfn2-RE con el dominio HR1 (Fig.48D).

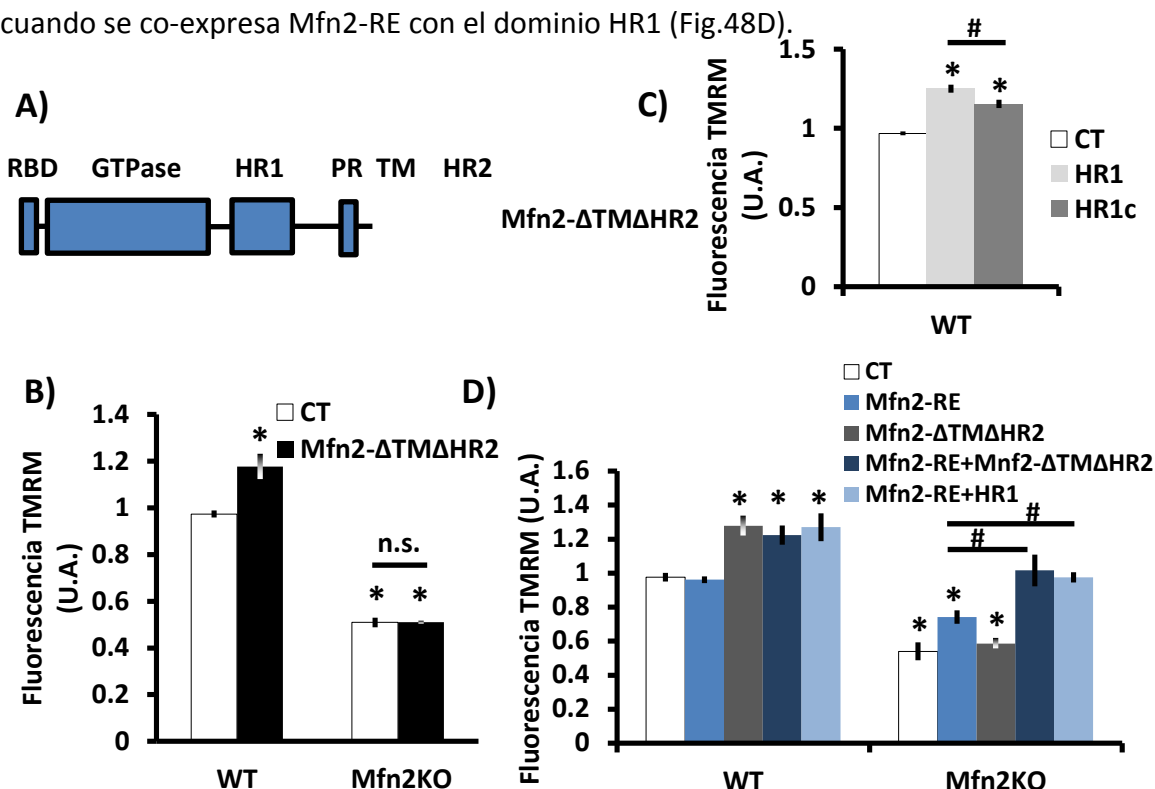


Figura 48: A) Representación esquemática de la forma citosólica de Mfn2. B-D) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) en fibroblastos WT y Mfn2KO transfectados con las formas indicadas (n=90 células en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. #p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05 respecto al control (n.s. = no significativo).

La mutación en el aminoácido 206 de Mfn2 relacionada con la enfermedad CMT2A causa defectos en el potencial de membrana mitocondrial

En pacientes de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A (CMT2A) se han descrito más de 100 mutaciones dominantes en el gen de Mfn2 (Filadi et al. 2018), siendo las más severas las del dominio GTPasa (Dorn 2020). Entre ellas, la mutación del aminoácido 206 se ha visto como una de las mutaciones más repetidas, hecho que denota la importancia de este aminoácido (Verhoeven 2006). Actualmente aún hay discrepancias sobre el mecanismo que produce la enfermedad, ya que parece que según la mutación se observan alteraciones distintas (Dorn 2020). En relación a la bioenergética mitocondrial existen también discrepancias, en estudios donde sí se han visto alteraciones en la misma (Guillet et al. 2011) y otros que no (Larrea et al. 2019), aunque en este último las mutaciones no ocurrían en el dominio GTPasa. Dado que observamos que la falta de dominio GTPasa tenía una implicación negativa sobre la bioenergética mitocondrial, quisimos comprobar el efecto de una mutación puntual en la misma. Para ello, se mutó Mfn2 para que presentara triptófano en vez de treonina en la posición 206 (Mfn2-T206W). Tras analizar el MMP se observó como la mutación en este aminoácido no rescata el déficit bioenergético de las células Mfn2KO (Fig.49).

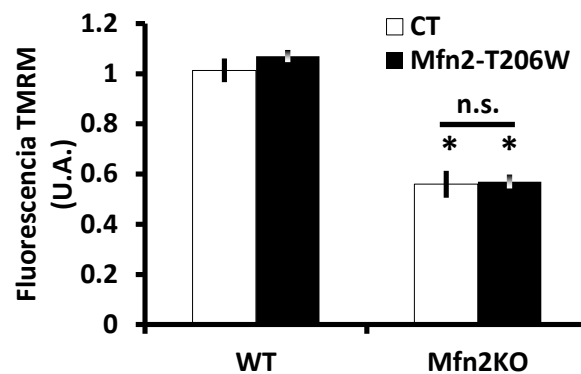


Figura 49: El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) en fibroblastos WT y Mfn2KO transfectados con una forma de Mfn2 mutada en el aminoácido 206 o un plásmido control (n=90 células en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey (n.s. = no significativo).

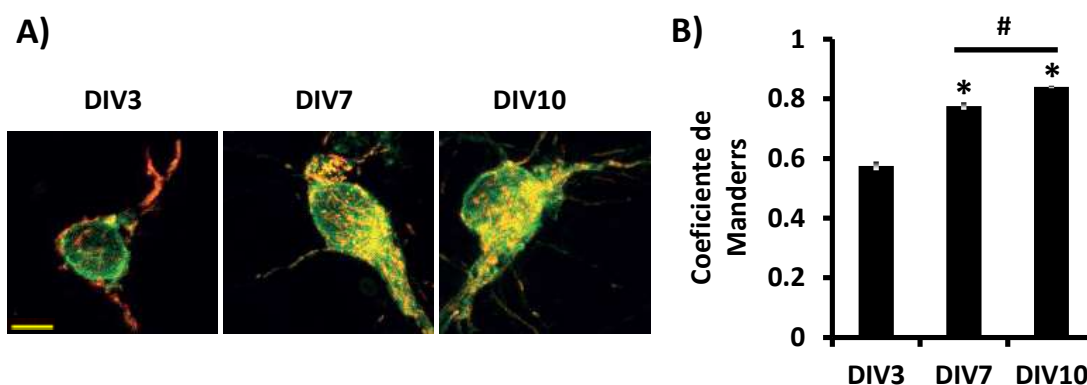
3. Implicación de la regulación de la bioenergética mitocondrial a través de Mfn2 en el desarrollo neuronal

Con el objetivo de consolidar los resultados descritos en los dos bloques anteriores y darle una mayor importancia fisiológica, en este bloque y el siguiente, se tratan dos procesos fisiológicos neuronales en los cuales el mecanismo estudiado podría estar implicado. Por lo tanto, los siguientes resultados están realizados en cultivos primarios de neuronas corticales murinas. Concretamente, el primer proceso fisiológico que se va a abordar es el crecimiento neurítico que acontece durante el desarrollo neuronal.

3.1. Mfn2 es importante en el establecimiento de contactos RE-mitocondrias durante el desarrollo neuronal

La expresión de Mfn2 aumenta de manera concomitante al incremento de co-localización entre RE y mitocondrias observado durante el desarrollo neuronal

En cultivos primarios neuronales hay un importante crecimiento neurítico entre los días (DIV) 3 y 7 (Dotti et al. 1988). A lo largo de estos días, la colocalización entre RE y mitocondrias aumentó gradualmente (Fig.50A, B), hecho que correlacionaba con un aumento en los niveles de expresión de Mfn2, VDAC y HSP60, éstos últimos indicativos de la masa mitocondrial, mientras que los niveles de Mfn1 se mantenían constantes (Fig.50C, D).



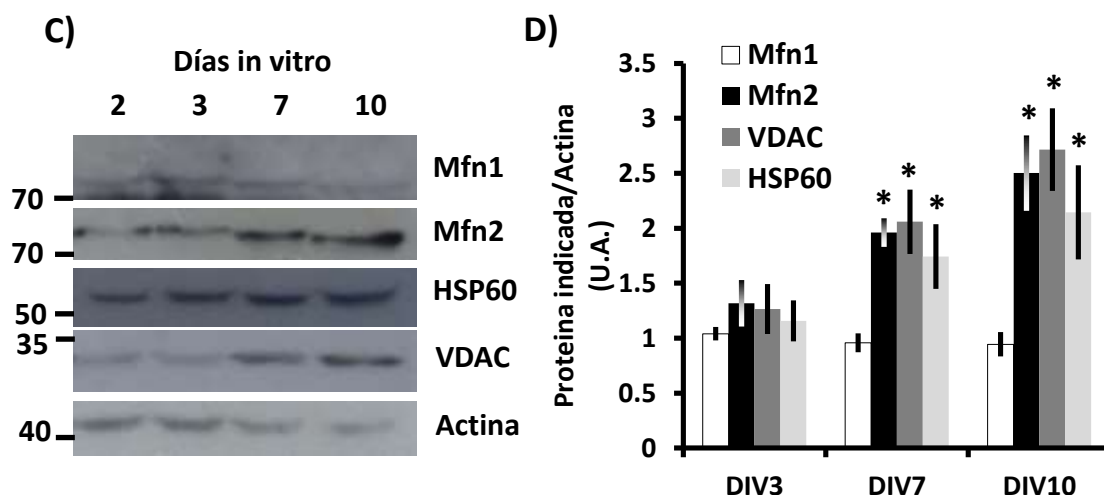


Figura 50: A) Imágenes representativas de neuronas a distintos estadios de su desarrollo co-transfectadas con mito-RFP y RE-GFP. Barra de escala: 5 μ m. B) Después de 48h, las neuronas fueron fijadas y el grado de colocalización entre RE y mitocondrias fue analizado mediante el coeficiente de Manders (n=21 neuronas analizadas en 3 experimentos independientes). C, D) *Western Blots* representativos y análisis densitométricos de las proteínas indicadas durante el desarrollo neuronal *in vitro* (n=3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. #p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05 respecto al control.

La falta de Mfn2 durante el desarrollo neuronal afecta negativamente a los contactos RE-mitocondrias

Para comprobar la importancia de Mfn2 en el establecimiento de las MAMs durante el desarrollo neuronal, se generó una colonia de ratones transgénicos en los cuales se suprimía la expresión de Mfn2 de manera inducible por tamoxifeno. Tras realizar los cultivos de neuronas corticales de ratón, se les aplicó tamoxifeno de DIV4 a DIV7, para inhibir la expresión de Mfn2 durante los días de mayor crecimiento neurítico, sin producir cambios en la masa mitocondrial (Fig.51A). La supresión de Mfn2 se tradujo en una disminución en la formación de contactos RE-mitocondria durante el desarrollo neuronal (Fig.51B, C), indicando que Mfn2 juega un papel clave en el aumento de las MAMs durante este periodo. La co-expresión de las formas Mfn2-RE y Mfn2-mt, así como la expresión de Mfn2 o ChiMERA permitieron recuperar los contactos en neuronas *knockout* para Mfn2. Por su parte, la expresión únicamente de Mfn2-mt no tenía efecto sobre las MAMs, mientras que la de Mfn2-RE producía un efecto parcial.

Por otro lado, se valoró también el MMP como indicador del estado bioenergético mitocondrial y se observó una reducción del MMP en neuronas *knockout* para Mfn2 (Fig.51D). De acuerdo con los resultados anteriores y los obtenidos en MEFs, de nuevo

solo la co-expresión de Mfn2-RE con Mfn2-mt y la expresión de Mfn2 o ChiMERA restablecieron totalmente el MMP. Estos resultados sugieren que, del mismo modo al mecanismo descrito en MEFs, Mfn2 también estaría implicada en la regulación de los contactos RE-mitocondria y la bioenergética mitocondrial en neuronas, aunque se necesitaría llevar a cabo experimentos adicionales para confirmarlo.

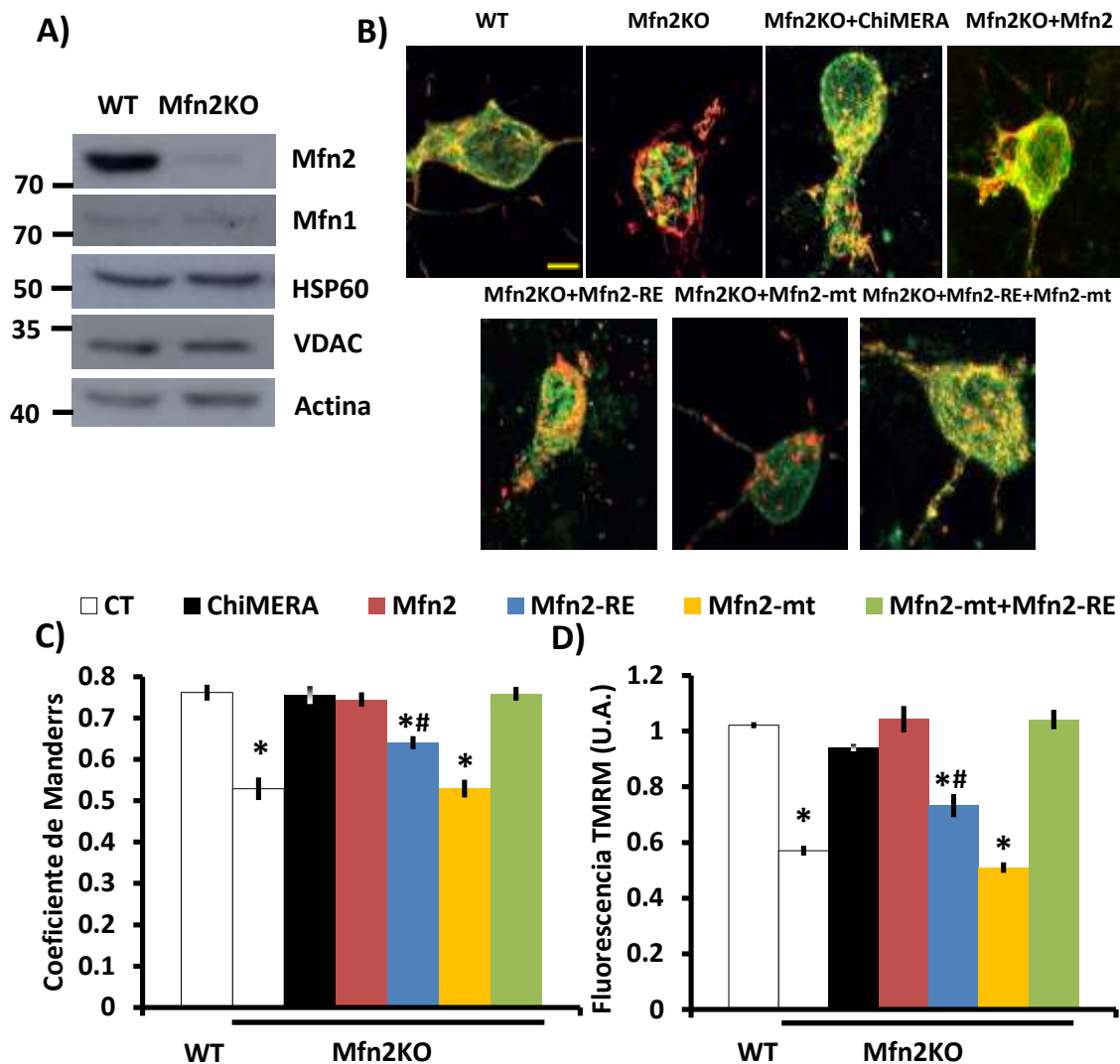
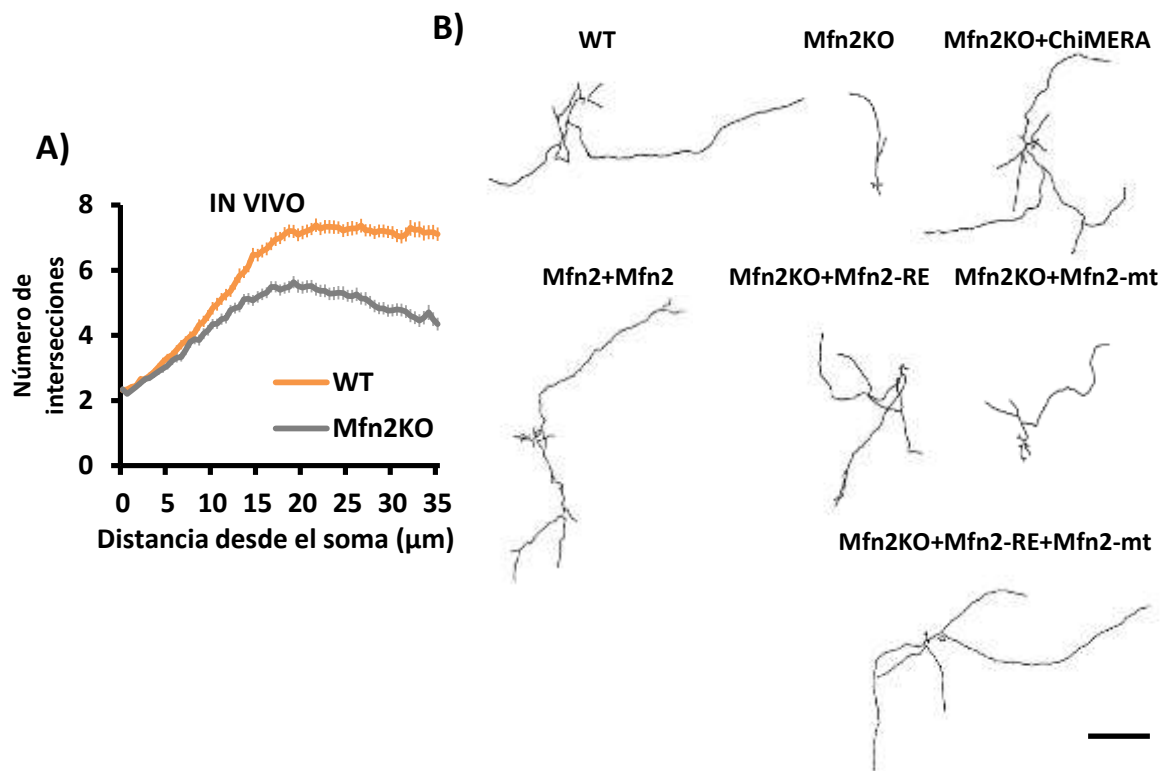


Figura 51: A) *Western Blots* representativos de cultivos de neuronas Mfn2KO inducibles por tamoxifeno a DIV7 tratadas con solvente o tamoxifeno (1 μ M) (n=3 experimentos independientes). B) Imágenes representativas de neuronas Mfn2KO inducibles por tamoxifeno a DIV7 tratadas con solvente o tamoxifeno (1 μ M) y co-transfectadas con mito-RFP, RE-GFP y los plásmidos indicados a DIV4. Barra de escala: 5 μ m. C) Después de 72h (DIV7), las neuronas fueron fijadas y el grado de colocalización entre RE y mitocondrias fue analizado mediante el coeficiente de Manders (n=15 neuronas analizadas en 3 experimentos independientes). D) El MMP se determinó midiendo la fluorescencia de TMRM (6nM) a DIV7 (n=90 células en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. *p<0,05 respecto WT, #p<0,05 respecto Mfn2KO, ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey.

3.2. La función enlazadora de Mfn2 promueve un correcto crecimiento neurítico durante el desarrollo neuronal

El RE y las mitocondrias tienen papeles clave durante el desarrollo neuronal y el crecimiento neurítico, principalmente a través de sus funciones energéticas (Vaarmann et al. 2016), de homeostasis del Ca^{2+} y síntesis de lípidos (Renvoisé & Blackstone 2010). Además, Mfn2 es necesaria para el crecimiento neurítico y la supervivencia neuronal *in vivo* (Chen et al. 2007), aunque el mecanismo por el cual regula estos procesos no se conoce.

Para confirmar la implicación de Mfn2 durante el desarrollo neuronal, se inyectaron tres dosis de tamoxifeno de manera intragástrica en crías entre los días P1 y P5, y se obtuvieron sus cerebros a día P13. El encéfalo murino experimenta un importante desarrollo durante los primeros días de vida (Semple et al. 2013), por lo que se eliminó la expresión de Mfn2 durante este periodo. Después de realizar una tinción de Golgi, se pudo determinar mediante un análisis de *Sholl* (Bird & Cuntz 2019) como las neuronas de las cortezas cerebrales de las crías a las cuales se les había inyectado tamoxifeno, poseían un árbol neurítico menos ramificado (Fig.52A). De acuerdo con



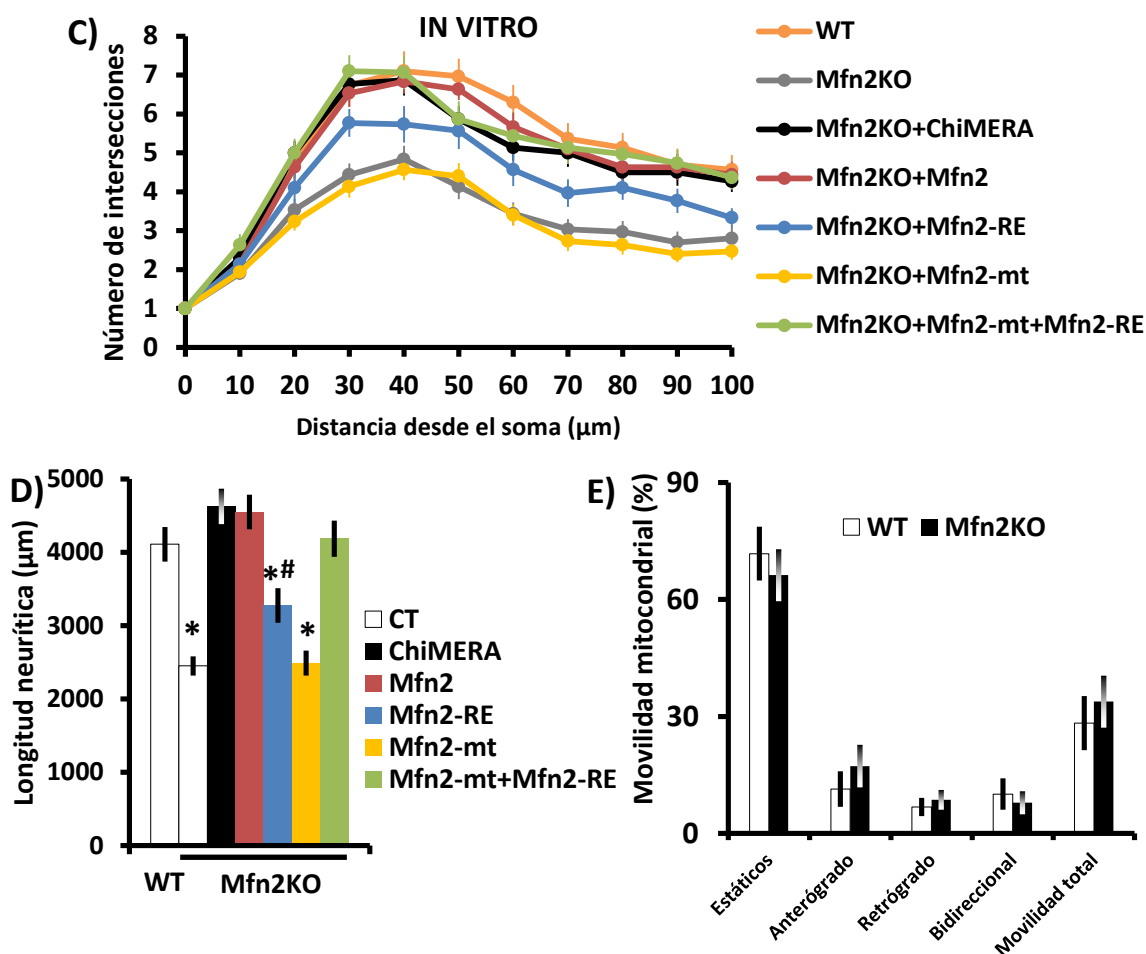


Figura 52: A) Determinación de la ramificación neurítica *in vivo* en crías de ratón a P12 inyectadas con tres dosis de solvente o tamoxifeno (50μl/cría) mediante un análisis de *Sholl*. B) Los cultivos *in vitro* de neuronas Mfn2KO inducibles por tamoxifeno fueron co-transfectados con GFP y los plásmidos indicados a DIV4 y tratados con solvente o tamoxifeno (1μM). Después de 72h (DIV7), las neuronas fueron fijadas y se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos anti-GFP. Barra de escala: 500μm. A partir de estas inmunofluorescencias, se determinó (C) la ramificación neurítica mediante análisis de *Sholl* y (D) la longitud neurítica (n=30 neuronas en 3 experimentos independientes). E) Los cultivos *in vitro* de neuronas Mfn2KO inducibles por tamoxifeno fueron transfectados con RFP a DIV4 y tratados con solvente o tamoxifeno (1μM). Después de 72h (DIV7), se analizó la movilidad mitocondrial en los axones mediante el conteo del número de mitocondrias en movimiento respecto al total, así como el tipo de movimiento que presentaban (n=15 neuronas en 3 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media ± SEM. *p<0,05 respecto WT, #p<0,05 respecto Mfn2KO, ANOVA de un factor seguido por una prueba post hoc de Tukey.

los resultados *in vivo*, se confirmó que la falta de Mfn2 provoca alteraciones en el crecimiento neurítico en cultivos primarios de neuronas Mfn2KO, concretamente en la ramificación y longitud neurítica (Fig.52B-D). Estas alteraciones se revirtieron completamente mediante la co-expresión de Mfn2-RE y Mfn2-mt o la expresión de Mfn2 o ChiMERA, y parcialmente expresando únicamente Mfn2-RE.

Se ha descrito que la pérdida de Mfn2, además de producir alteraciones en la bioenergética mitocondrial, también produce defectos en la movilidad mitocondrial durante la sinaptogénesis (Fang et al. 2016). No obstante, en las condiciones experimentales utilizadas no se observaron defectos en la movilidad mitocondrial de las neuronas Mfn2KO (Fig.52E), por lo que es improbable que los defectos observados en el crecimiento neurítico sean debidos a alteraciones en la movilidad mitocondrial. Este ensayo fue llevado a cabo por la Dra. Raquel Larramona, integrante del grupo de investigación.

3.3. La falta de Mfn2 afecta negativamente la formación de espinas dendríticas y altera la actividad sináptica

La falta de Mfn2 afecta negativamente la formación de espinas durante el desarrollo neuronal in vivo

A parte de ser importante para el crecimiento neurítico, también se ha descrito que Mfn2 está implicada en la formación de espinas dendríticas durante el desarrollo neuronal (Chen et al. 2007). Así pues, también se analizó la formación de espinas dendríticas en cerebros de ratones Mfn2KO inducibles por tamoxifeno a día P13, tras inyectar tres dosis de tamoxifeno entre los días P1 y P5. Se analizaron los parámetros básicos para el estudio de las espinas dendríticas, como son la densidad, la longitud de las espinas y su grosor. En estas mediciones se pudo determinar que las crías inyectadas con tamoxifeno poseían menor densidad de espinas en sus dendritas (Fig.53A, B) y éstas eran más cortas (Fig.53C). Por su parte, no se observaron diferencias significativas en el grosor de las espinas comparando crías inyectadas con tamoxifeno o sin inyectar (Fig.53D).

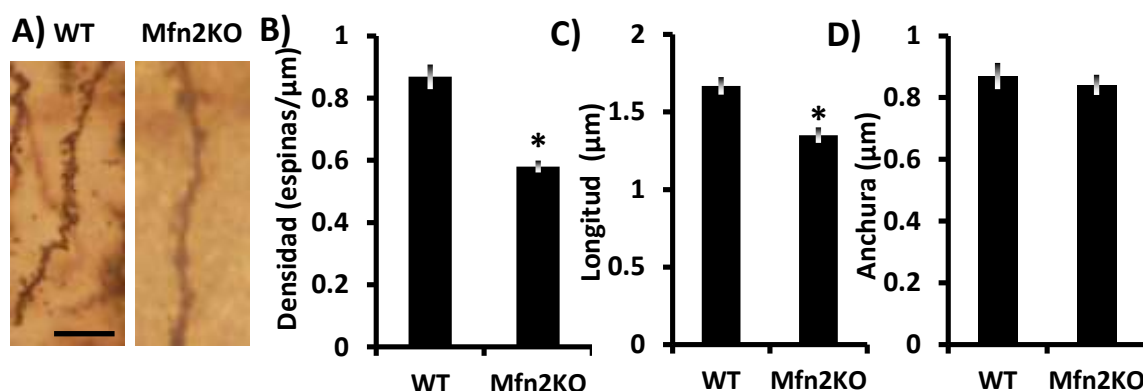


Figura 53: A) Imágenes representativas de espinas dendríticas *in vivo* de crías de ratón a P12 inyectadas con tres dosis de solvente o tamoxifeno (50 μ l/cría). Barra escala: 20 μ m. Se midió la (B) densidad de espinas/ μ m y la (C) longitud y (D) anchura de las mismas. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * p <0,05, prueba t de Student.

La falta de Mfn2 en ratones adultos provoca alteraciones en las espinas dendríticas

La transmisión sináptica excitatoria se da principalmente en las espinas dendríticas postsinápticas, y promueve el aprendizaje y la memoria (Dickstein et al. 2013). La pérdida de espinas dendríticas correlaciona con la pérdida de la función sináptica, hecho característico de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson o Huntington (Herms & Dorostkar 2016), así como de la demencia asociada al envejecimiento (Ferrer 1999). Dado que la pérdida de Mfn2 causa alteraciones en la formación de las espinas dendríticas durante el desarrollo cerebral, se quiso comprobar si a largo plazo también provocaba alteraciones en las mismas en ratones adultos. Para ello, se administraron tres dosis de tamoxifeno en ratones adultos Mfn2KO inducibles por tamoxifeno de 8 meses de edad y se obtuvieron sus cerebros después de un mes. Tras realizar la tinción de Golgi se observó que, al igual que en el desarrollo neuronal, en neuronas piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial, los ratones tratados con tamoxifeno presentaban menor densidad de espinas (Fig.54A, B) y éstas eran más cortas (Fig.54C), mientras que no se observaban diferencias en su grosor (Fig.54D). Por lo tanto, la falta de Mfn2 provoca

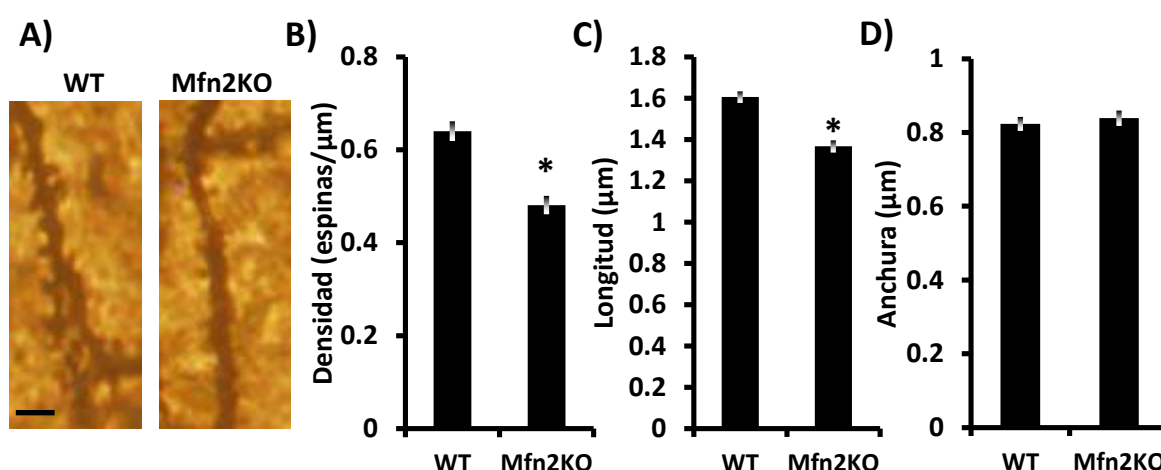


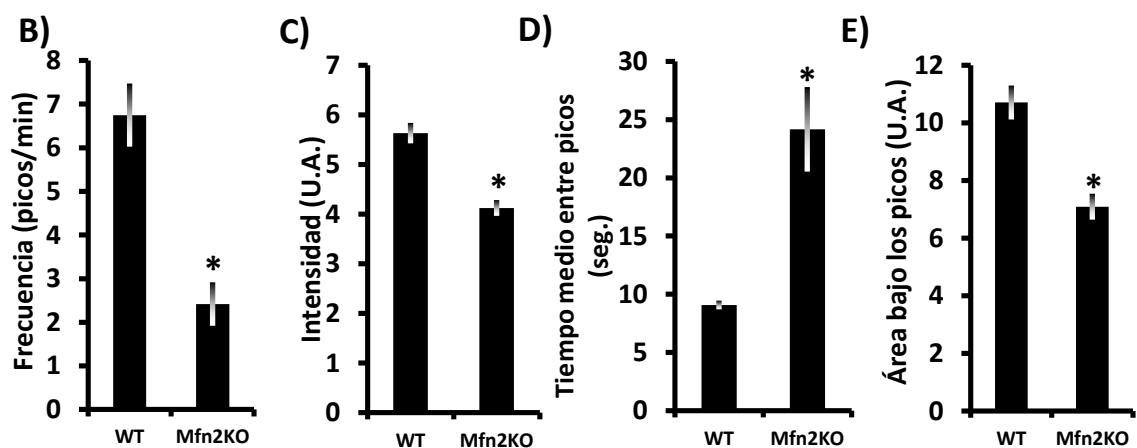
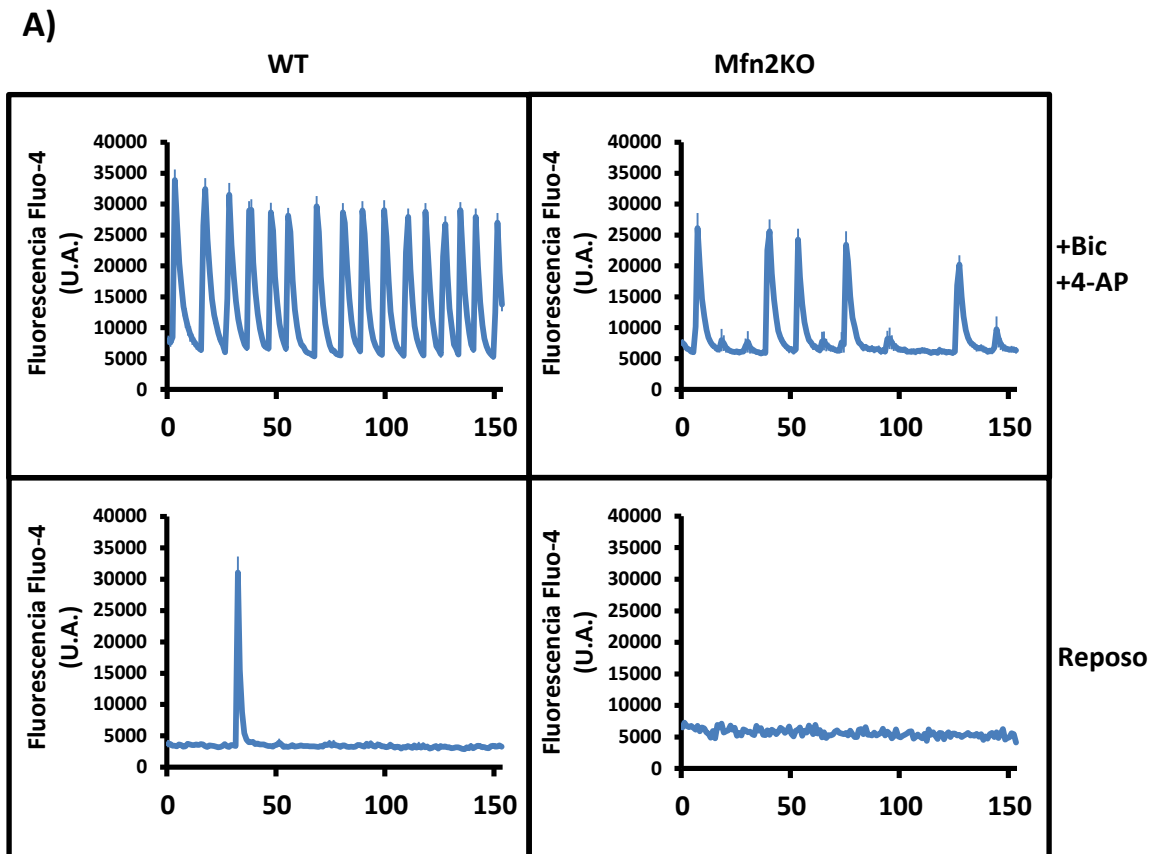
Figura 54: A) Imágenes representativas de espinas dendríticas *in vivo* de ratones adultos de 9 meses administrados un mes antes con tres dosis de solvente o tamoxifeno (75mg/kg ratón). Barra escala: 25 μ m. Se midió la (B) densidad de espinas/ μ m y la (C) longitud y (D) anchura de las mismas. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * p <0,05, prueba t de Student.

también alteraciones en las espinas dendríticas de ratones adultos, hecho que podría repercutir en alteraciones tempranas en la cognición en condiciones patológicas donde los niveles de Mfn2 se ven reducidos. No obstante, aunque son resultados prometedores, se debería profundizar más en el estudio de este fenómeno para poder sacar conclusiones con mayor solidez.

La falta de Mfn2 provoca alteraciones en la activación sináptica

La ramificación dendrítica está estrechamente ligada con las señales sinápticas que reciben las neuronas en desarrollo, y es en las espinas dendríticas donde se producen estas sinapsis (Cline 2001). De hecho, la actividad sináptica promueve el crecimiento neurítico (Segarra-Mondejar et al. 2018). Durante la actividad sináptica grandes cantidades de Ca^{2+} entran en el citoplasma de manera transitoria, donde estimulan la respiración mitocondrial y activan cascadas de señales esenciales para los procesos fisiológicos que deben llevar a cabo las neuronas (Rueda et al. 2016). Dadas las alteraciones observadas en el crecimiento neurítico y la formación de las espinas dendríticas ante la falta de Mfn2, se quiso determinar si también existían perturbaciones en la actividad sináptica en estas condiciones. Con el objetivo de promover la actividad sináptica, se usó un método previamente establecido que consiste en desinhibir el circuito neuronal a través de la aplicación de Bicuculina (Bic), antagonista del receptor GABAA, y de 4AP, antagonista de canales de K^+ (Hardingham et al. 2001). Monitorizando el Ca^{2+} citoplasmático mediante la sonda Fluo-4, al aplicar dicho tratamiento se observó instantáneamente la aparición de picos de Ca^{2+} correspondientes a las continuas entradas de Ca^{2+} extracelulares provocadas por la actividad sináptica (Fig.55A). Cabe destacar, que antes de realizar las estimulaciones de la actividad sináptica, en las neuronas no tratadas con tamoxifeno aparecía algún pico de Ca^{2+} espontáneo por la propia actividad neuronal del cultivo, mientras que en las Mfn2KO no, hecho que denotaba una menor predisposición a la actividad sináptica en condiciones de reposo. Para analizar de manera cuantitativa la dinámica del Ca^{2+} durante la actividad sináptica, se midieron distintos parámetros tras la estimulación. Centrándonos en las neuronas estimuladas, en primer lugar se midió la frecuencia de aparición de los picos de Ca^{2+} , siendo claramente menor en las neuronas Mfn2KO (Fig.55B). Además, se midió la intensidad media de los picos de Ca^{2+} y también era

menor en las neuronas Mfn2KO (Fig.55C). Posteriormente, se analizó el tiempo medio que transcurría entre pico y pico, y en las neuronas Mfn2KO transcurría de media más del doble de tiempo que en las neuronas control (Fig.55D). Finalmente, se midió el área bajo la curva de los distintos picos, y en las neuronas Mfn2KO era menor (Fig.55E), denotando una menor cantidad de Ca^{2+} citoplasmático cuando éste entra al interior de la célula.



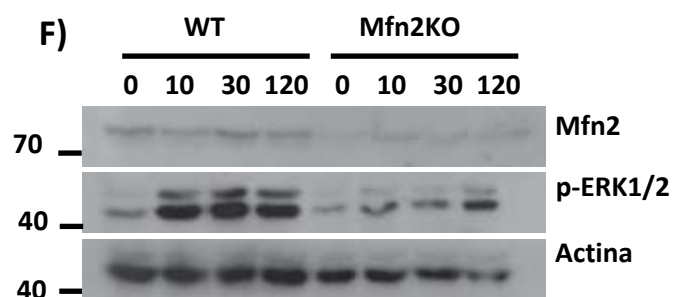


Figura 55: A) Gráficos representativos de la determinación del Ca^{2+} citoplasmático mediante la sonda Fluo-4 ($2\mu\text{M}$) en cultivos neuronales *in vitro* de neuronas Mfn2KO inducibles por tamoxifeno tras estimular la actividad sináptica con Bic ($50\mu\text{M}$) y 4AP (250nM) a DIV10. Las neuronas fueron previamente tratadas con solvente o tamoxifeno ($1\mu\text{M}$). Se midió la (B) frecuencia de picos, (C) intensidad, (D) tiempo medio entre picos y (E) área bajo los picos. F) *Western Blots* representativos de las proteínas indicadas tras estimular la actividad sináptica durante 10, 30, o 120 minutos. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$, prueba t de Student.

Por otro lado, la proteína quinasa ERK1/2, a parte de su distribución en el núcleo y citoplasma, se encuentra notablemente localizada en las dendritas y espinas dendríticas de las neuronas postsinápticas, donde actúa como un importante regulador de la señalización intracelular en respuesta a las señales sinápticas, al fosforilarse de manera reversible (Mao & Wang 2016). De este modo, esta proteína realiza funciones fundamentales en la plasticidad sináptica. Tras estimular la actividad sináptica aplicando Bic y 4APB, mediante *Western Blot* se observó una clara reducción en los niveles de fosforilación de ERK1/2 (p-ERK1/2) en neuronas Mfn2KO (Fig.55F). Estos resultados indican que durante la activación sináptica las neuronas Mfn2KO están sometidas a alteraciones en la dinámica del Ca^{2+} , hecho que podría estar involucrado también negativamente en el crecimiento neurítico y la conformación de la red neuronal. No obstante, estos son unos resultados muy preliminares y es necesario complementarlos con una investigación más extensa.

4. Implicación de la regulación de las MAMs a través de Mfn2 en eventos excitotóxicos

Durante la excitotoxicidad se produce una entrada masiva de Ca^{2+} hacia el citoplasma neuronal, donde RE y mitocondrias juegan un importante papel en la regulación del mismo (Rueda et al. 2016). Dado que se ha descrito el carácter neuroprotector de Mfn2 frente a diferentes eventos neurotóxicos (Jahani-Asl et al. 2007; Zhu et al. 2017;

Zhao et al. 2021), en este último bloque de resultados se pretende estudiar la posible implicación del mecanismo de regulación de Mfn2 en los contactos RE-mitocondrias en un proceso fisiopatológico como es la excitotoxicidad.

4.1. La expresión de ChiMERA permite obtener un menor reclutamiento de Bax en las mitocondrias frente a un insulto excitotóxico

Frente a una sobreactivación persistente de los receptores de NMDA, acontece un aumento continuo y acusado de Ca^{2+} intracelular que desencadena en última instancia en muerte neuronal (Wang & Qin 2010). En primera instancia, las neuronas mueren por necrosis, pero aquellas que sobreviven llevan a cabo un proceso de muerte por apoptosis tardía y de manera dependiente de las mitocondrias (Ankarcrona et al. 1995). Es en esta fase tardía los niveles de Mfn2 se ven disminuidos, hecho que se ve acompañado por disfunción mitocondrial, alteración de homeostasis del Ca^{2+} y un mayor reclutamiento de Bax a las mitocondrias (Martorell-Riera et al. 2014). Con tal de simular condiciones excitotóxicas *in vitro*, se trató con dosis moderadamente tóxicas de NMDA durante una hora y se dejaron tres o cinco horas de reposo para que aconteciera la fase de muerte tardía. Mediante *Western Blot*, se confirmó como en estas condiciones, los niveles de Mfn2 se vieron disminuidos (Fig.56A). En el caso de las neuronas no tratadas, Bax se encontraba de manera difusa por todo el citoplasma, mientras que tras el tratamiento con NMDA se encontraba reclutado en zonas concretas de las mitocondrias (Fig.56B). Así pues, tras estos tratamientos se determinó un aumento en la localización de Bax en las mitocondrias mediante el cálculo del coeficiente de Manders (Fig.56C), respecto al control. Estas observaciones concordaron con la cuantificación de neuronas en las cuales Bax se había reclutado hacia las mitocondrias, las cuales mostraban un mayor porcentaje tras el tratamiento con NMDA (Fig.56D), hecho distintivo de un estado apoptótico. No obstante, sobreexpresando ChiMERA o Mfn2 durante el proceso excitotóxico, se observó un menor porcentaje de neuronas en las cuales Bax se había reclutado en las mitocondrias (Fig.56D). Este mecanismo neuroprotector es independiente de la función de fusión mitocondrial de Mfn2, ya que ChiMERA no era capaz de recuperar la morfología mitocondrial (Fig.56E) pero sí de disminuir el reclutamiento de Bax.

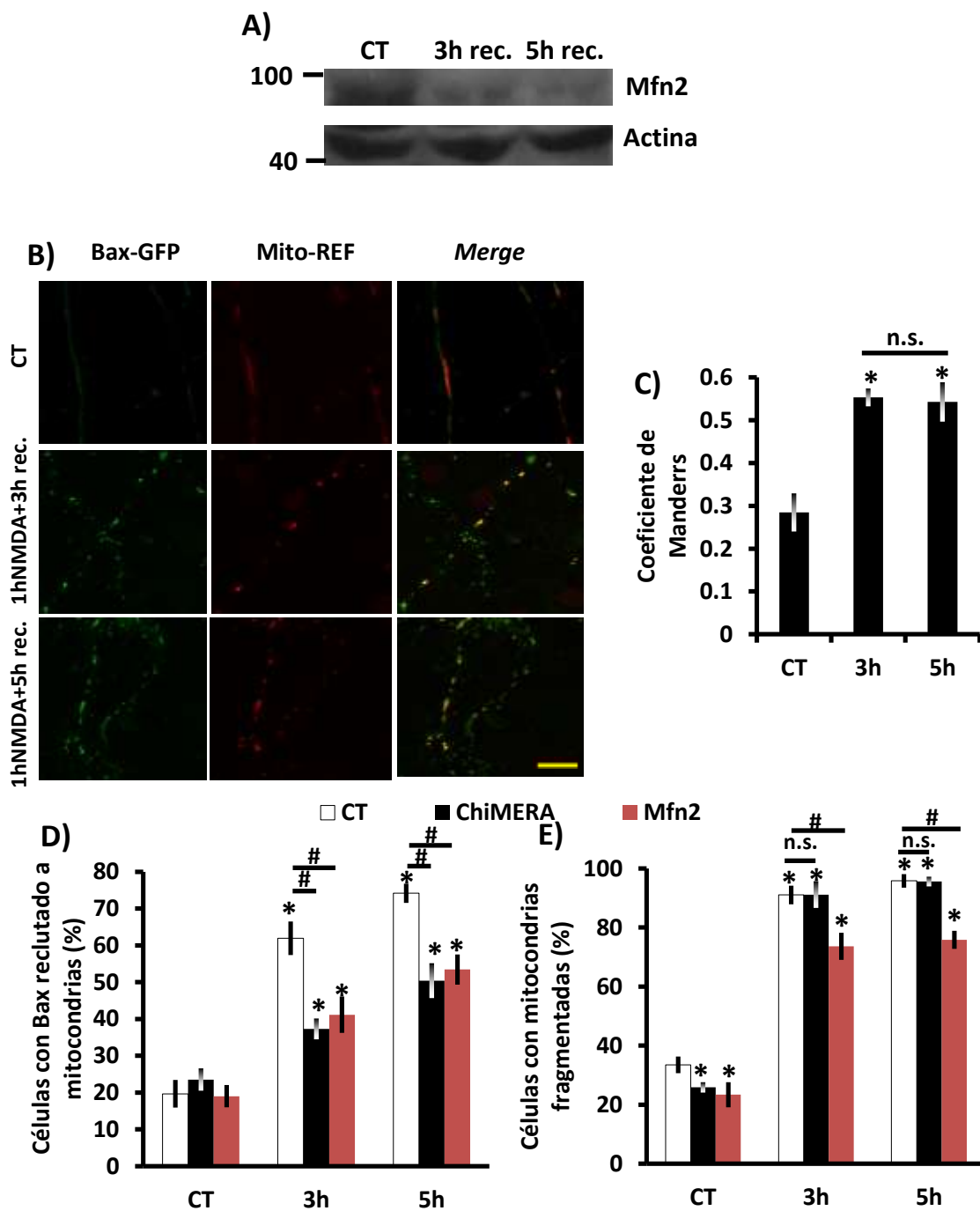


Figura 56: A) *Western Blots* representativos de las proteínas indicadas en neuronas control o tratadas durante 1 hora con NMDA (30 μ M) y posterior recuperación de 3 o 5 horas. B) Imágenes representativas de Bax-GFP y mito-RFP, donde se muestra su colocalización en neuronas control o tras los tratamientos. C) El coeficiente de Manders fue medido en las neuronas control o tras las tratamientos (n=10 células en 3 experimentos independientes). D) Porcentaje de neuronas que muestra la localización típica del reclutamiento de Bax hacia las mitocondrias (n=178-267 neuronas en 5 experimentos independientes). E) Porcentaje de neuronas que muestran morfología mitocondrial globular (n=174-274 neuronas en 5 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. # p <0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. * p <0.05 respecto a su control (n.s. = no significativo).

4.2. La expresión de las formas HR1 o HR1c disminuyen el reclutamiento de Bax en las mitocondrias frente a un insulto excitotóxico

El hecho que la modulación de las MAMs mediante Mfn2 pudiera ser un mecanismo neuroprotector frente la excitotoxicidad tardía, lleva a pensar que la manipulación de este proceso podría ser usado con fines terapéuticos. Por ejemplo, en un evento excitotóxico provocado tras un daño cerebral como puede ser un accidente cerebrovascular, las neuronas que mueren en el proceso tardío por apoptosis pueden considerarse como dianas a través de la regulación de las MAMs para mitigar al máximo posible los efectos producidos el daño cerebral. Dado que ante un insulto excitotóxico no disminuyen totalmente los niveles de Mfn2 (Fig.56A), se abre la posibilidad de intentar incidir sobre estas pocas interacciones que sigan manteniéndose, bloquear el reclutamiento de Bax a las mitocondrias y mantener la bioenergética mitocondrial. Es por este motivo que se pensó en utilizar de nuevo las formas HR1 y HR1c, las cuales solo ante la presencia de mitofusinas endógenas permitían estimular la bioenergética mitocondrial (Fig.48C, D). Satisfactoriamente, la expresión de dichas formas también mostraba un menor porcentaje de reclutamiento de Bax a las mitocondrias (Fig.57A) de manera independiente al proceso de fusión mitocondrial (Fig.57B), denotando así su potencial como herramienta terapéutica.

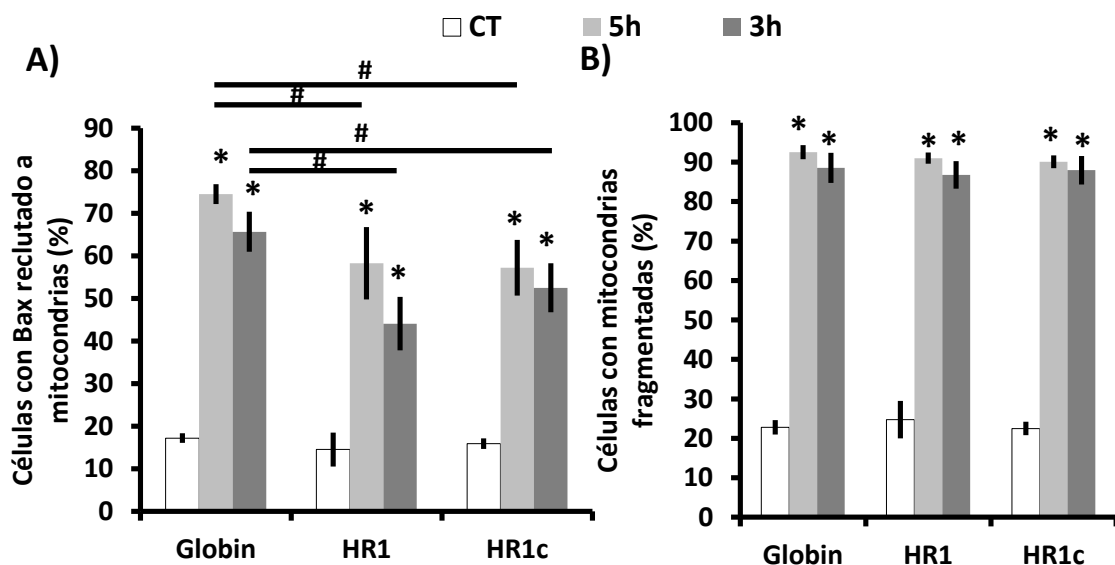
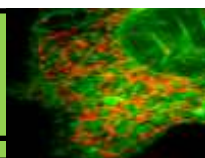


Figura 57: A) Porcentaje de neuronas control o tratadas durante 1 hora con NMDA (30 μ M) y posterior recuperación de 3 o 5 horas que muestran la localización típica del reclutamiento de Bax hacia las mitocondrias (n=120-193 neuronas en 4 experimentos independientes). B) Porcentaje de neuronas que muestran morfología mitocondrial globular (n=103-191 neuronas en 4 experimentos independientes). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. #p<0,05, ANOVA de un factor seguido por una prueba *post hoc* de Tukey. *p<0.05 respecto a su control.

Aunque los resultados obtenidos sugieran que el mecanismo implicado podría ser el descrito en los dos primeros bloques, de nuevo, son unos resultados muy preliminares. Sería necesario realizar más aproximaciones al respecto antes de enunciar conclusiones sólidas sobre su mecanismo de acción, como por ejemplo analizar el restablecimiento de los contactos RE-mitocondrias al expresar estas formas.

DISCUSIÓN



Un gran número de estudios han demostrado que Mfn2 está relacionada con la regulación del metabolismo y la bioenergética mitocondrial, ya que su supresión afecta negativamente ambos procesos (Bach et al. 2003; Pich et al. 2005; Chen et al. 2005; Mourier et al. 2015; Tur et al. 2020; Xu et al. 2020) y su sobreexpresión los estimula (Pich et al. 2005). Mutaciones en Mfn2 son la principal causa de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A, un grupo de distintas neuropatías caracterizadas por degeneración axonal (Züchner et al. 2004). Además, alteraciones en Mfn2 han sido descritas en múltiples enfermedades neurodegenerativas crónicas, en episodios traumáticos agudos como accidentes cerebrovasculares e incluso otras enfermedades no neurológicas como las cardiometabólicas (Bach et al. 2003; Pich et al. 2005; Xinglong Wang et al. 2009; Lee et al. 2012; Kumari et al. 2012; Martorell-Riera et al. 2014). La especial importancia de Mfn2 en la fisiología neuronal queda patente durante su propio desarrollo, ya que su falta produce alteraciones en el mismo (Chen et al. 2007; Lee et al. 2012; Fang et al. 2016), o en su capacidad neuroprotectora (Jahani-Asl et al. 2007; Zhu et al. 2017; Zhao et al. 2021). Así pues, dado el importante papel de Mfn2 en el metabolismo mitocondrial, y su implicación directa en la fisiopatología neurológica de estos trastornos, dilucidar el mecanismo por el cual Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial puede tener implicaciones en el diseño de estrategias terapéuticas.

1. La función enlazadora de Mfn2 permite la activación de la bioenergética mitocondrial a través de la regulación de las MAMs y la transferencia de Ca^{2+}

Las mitofusinas 1 y 2 son unas proteínas que se encuentran en la membrana mitocondrial externa, en la cual se encargan de llevar a cabo el proceso de fusión de esta membrana (Santel & Fuller 2001; Rojo et al. 2002; Bach et al. 2003). La dinámica mitocondrial es un proceso adaptativo en el que se modula la morfología mitocondrial en función del entorno y los requerimientos energéticos de las células (Wai et al. 2016). Por lo tanto, comúnmente se asocia una morfología tubular a un correcto estado bioenergético mitocondrial y una morfología fragmentada a eventos

patológicos o de estrés (Liesa et al. 2009; Westermann 2012; Mishra & Chan 2016b). En nuestra línea de MEFs Mfn2KO, y en consonancia con otros estudios (Yao et al. 2019; Hu et al. 2020), la falta de Mfn2 causa la fragmentación de las mitocondrias y una disminución de la bioenergética mitocondrial en comparación con la línea WT. Por su parte, en la línea Mfn1KO, ante la falta de Mfn1 aumenta aún más el fraccionamiento mitocondrial, ya que su actividad en la fusión es mayor que la de Mfn2 (Chen et al. 2003; Ishihara et al. 2004), pero su bioenergética no se ve alterada. De hecho, a diferencia de Mfn2, se ha descrito que Mfn1 parece no intervenir en el metabolismo mitocondrial (Silva Ramos et al. 2016). Por tanto, estos resultados sugieren que el mecanismo de regulación de la bioenergética mitocondrial a través de Mfn2 se lleva a cabo de manera independiente al proceso de dinámica mitocondrial, de acuerdo con otros estudios (Pich et al. 2005; Segalés et al. 2013). Del mismo modo, existen otros estudios en los que también se observa una independencia entre dinámica y bioenergética mitocondrial en diferentes situaciones fisiológicas (Karavaeva et al. 2015; Silva Ramos et al. 2016; Wang et al. 2018), de manera contraria al modelo más comúnmente aceptado en el cual se describe una relación entre ambos procesos (Liesa et al. 2009; Westermann 2012; Mishra & Chan 2016b). La idea de que la bioenergética mitocondrial no depende la morfología mitocondrial se valoró modulando los procesos de fusión y fisión en células Mfn2KO al sobreexpresar Mfn1 y DN-Drp1, respectivamente. En ambos casos, se recuperó la morfología mitocondrial tubular, pero no se observó ningún cambio en el déficit bioenergético. Esta podría ser la explicación de por qué existen ciertas mutaciones en aminoácidos puntuales de Mfn2 asociadas a alteraciones del metabolismo mitocondrial en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth de tipo 2 (CMT2A), en las cuales la red mitocondrial permanece con la morfología intacta (Loiseau et al. 2007).

En consonancia con los resultados presentados en esta tesis, la pérdida de Mfn2 se asocia ampliamente a una reducción en la respiración mitocondrial en diferentes tipos celulares (Bach et al. 2003; Sebastián et al. 2012; Martorell-Riera et al. 2014; Boutant et al. 2017; Tur et al. 2020; Xu et al. 2020), como es el caso de los fibroblastos (Yao et al. 2019; Hu et al. 2020). No obstante, también se ha descrito un aumento en el consumo de oxígeno (OCR) en fibroblastos Mfn2KO, aunque sin cambios en el RCR y

con disminuciones en el MMP y producción de ATP en las mitocondrias (Kawalec et al. 2015). Estas discrepancias observadas en la bioenergética mitocondrial, concretamente en el OCR, y la manera en la que Mfn2 estaría involucrada no están del todo claras. Este hecho podría fundamentarse en que las medidas de OCR realizadas en dicho estudio se llevaron a cabo en células en suspensión después de ser tripsinizadas (Kawalec et al. 2015), lo cual concuerda con un aumento en el OCR observado también en otro estudio en fibroblastos Mfn2KO en suspensión (Thaher et al. 2018). De hecho, desde hace años se sabe que la pérdida de contactos entre la matriz y la célula modifica el metabolismo mitocondrial (Werner & Werb 2002; Irwin et al. 2003). Uno de los mecanismos descritos en la regulación del metabolismo mitocondrial dependientes de contactos célula-matriz es a través de las funciones no canónicas de Stat3. Esta proteína localiza en la zona de las MAMs, tanto en RE como en mitocondria, a través de la señalización por integrinas, donde regula el transporte de Ca^{2+} (Visavadiya et al. 2016; Avalle et al. 2019). Así pues, Mfn2 también podría estar involucrada en el mecanismo de regulación del metabolismo y bioenergética mitocondrial mediante las MAMs y el intercambio de Ca^{2+} , a través de vías dependientes de contactos célula-matriz, aunque estas no han sido analizadas en esta tesis.

Aunque Mfn2 se encuentra principalmente en las mitocondrias, alrededor de un 5-10% localiza también en el RE, concretamente en la zona de la membrana del RE que se encuentra próxima a las mitocondrias (MAMs), donde establece contactos con las mitofusinas 1 y 2 mitocondriales (de Brito & Scorrano 2008). El papel de Mfn2 en las MAMs es controvertido respecto a si actúa enlazando ambos orgánulos (de Brito & Scorrano 2008; Hailey et al. 2010; Area-Gomez et al. 2012; Sugiura et al. 2013; Naon et al. 2016; Basso et al. 2018) o separándolos (Cosson et al. 2012; Filadi et al. 2015; Leal et al. 2016). En nuestro modelo, Mfn2 ejecuta un papel de enlazadora, tal como se demuestra mediante tres aproximaciones distintas. No obstante, hace relativamente poco, se publicó un estudio con presencia de autores defensores de ambas posturas, en el cual se define que Mfn2 no tiene un papel totalmente enlazador ni separador, sino que favorece más un tipo u otro de contacto. Mediante el uso de unos sensores basados en GFP que emiten fluorescencia cuando se encuentran a una distancia

próxima (8-10nm) y lejana (40-50nm), demostraron que la ausencia de Mfn2 aumenta los contactos estrechos y disminuye los contactos anchos (Cieri et al. 2018). En nuestro modelo, se pudo comprobar mediante microscopía electrónica que ante la falta de Mfn2 hay una ligera tendencia a disminuir los contactos entre 25-50 nm, de acuerdo con el estudio de *Cieri et al.*, donde se observa una disminución en los contactos entre 40-50 nm. En el estudio de *Cieri et al.*, se muestra un aumento en los contactos de menos de 10 nm ante la falta de Mfn2, mientras que en esta tesis, se muestra una clara disminución en los contactos menores de 25nm, donde también están englobados los menores de 10 nm. Dado que la distancia óptima para la transferencia de Ca^{2+} a través de las MAMs son 12-24nm (Giacomello & Pellegrini 2016), es muy probable que este tipo de contacto tenga un peso importante dentro de los diferentes contactos funcionales que se establecen en las MAMs. De hecho, mediante microscopía electrónica, se pudo observar que éstos son los contactos más frecuentes de los tres rangos analizados en células WT. Con la medida de la actividad de ERMITO-RLuc se pudo confirmar la implicación directa de Mfn2 en la formación exclusiva de este tipo de contactos, ya que en esta medida no se incluyen los contactos menores de 10 nm. Por su parte, Mfn1 no parece estar implicada en la regulación de la distancia entre ambos orgánulos, tal y como se ha ido observando hasta la fecha (Yu et al. 2021; Smith 2021; Leal & Martins 2021).

Las mitocondrias captan el Ca^{2+} a través del canal MCU, el cual presenta baja afinidad por el mismo (De Stefani et al. 2011; Baughman et al. 2011; Marchi & Pinton 2014), pero gracias a las zonas de contacto entre mitocondrias y RE, se generan unos microdominios con altas concentraciones de Ca^{2+} que facilitan el paso del Ca^{2+} a través de los canales MCU (Rizzuto et al. 1998). Los resultados presentados en esta tesis muestran una menor cantidad de contactos en el rango óptimo para el intercambio de Ca^{2+} en células Mfn2KO, lo cual correlaciona con una alteración en el mismo. Concretamente, la falta de Mfn2 provoca una menor transferencia de Ca^{2+} desde el RE hacia las mitocondrias, causando una mayor acumulación de Ca^{2+} en el RE y una disminución de Ca^{2+} mitocondrial. El Ca^{2+} mitocondrial activa diferentes deshidrogenasas mitocondriales, como la piruvato deshidrogenasa u otras del ciclo del ácido cítrico (Denton et al. 1980; Glancy & Balaban 2012; Sassano et al. 2017), así

como varios complejos de la cadena transportadora de electrones (Glancy et al. 2013). Por lo que el Ca^{2+} es esencial en la estimulación de la respiración mitocondrial (Cárdenas et al. 2010). De acuerdo con la disminución de Ca^{2+} mitocondrial observada en células Mfn2KO, el aumento en la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa, hecho indicativo de una disminución en su actividad, refuerza la importancia de la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias para la activación del metabolismo y bioenergética mitocondrial.

Con tal de confirmar la regulación de la bioenergética mitocondrial por Mfn2 a través de los contactos RE-mitocondria, en la línea Mfn2KO se mimetizó únicamente la función enlazadora de Mfn2 pero sin su presencia, mediante el enlazador artificial "ChiMERA". De este modo, tras observar el restablecimiento del intercambio de Ca^{2+} entre RE y mitocondrias, las MAMs y la bioenergética mitocondrial, se confirmó que la regulación de estos procesos recae sobre la función enlazadora de Mfn2. Concretamente, ChiMERA permite reestablecer los contactos de rango óptimo para el intercambio de Ca^{2+} en las células Mfn2KO a unos niveles equiparables a los de las células WT, por lo que constituye una herramienta muy útil para el estudio de este proceso. De este modo, se pudo comprobar que el bloqueo de la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias no permite la recuperación de la bioenergética mitocondrial pese a forzar la unión entre ambos orgánulos mediante la expresión del enlazador ChiMERA. Por lo tanto, la distancia física entre ambos orgánulos no regula de manera directa la bioenergética mitocondrial, sino que lo hace de manera necesaria a través de la regulación la transferencia de Ca^{2+} .

En esta tesis se demuestra que la activación de la bioenergética mitocondrial requiere de la presencia de Mfn2 en el RE, y que a través de sus interacciones con las mitofusinas mitocondriales, actúa como enlazadora situando a los contactos RE-mitocondrias en una distancia óptima para la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias (Fig.58A). El Ca^{2+} captado por las mitocondrias a su vez, activa tanto su metabolismo como su bioenergética, produciendo en definitiva un estado funcional óptimo en las mitocondrias. Por lo tanto, ante la falta de Mfn2, la distancia óptima para el transporte de Ca^{2+} se pierde y éste no se lleva a cabo de manera tan eficiente, hecho que conlleva repercusiones negativas en su metabolismo y bioenergética

(Fig.58B). Otros estudios ya han descrito previamente relaciones entre la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias, la bioenergética mitocondrial y Mfn2, en los cuales el mecanismo descrito en esta tesis (Fig.58A) encaja con sus observaciones expuestas. Por ejemplo, por un lado en *Drosophila* se demostró que la activación del metabolismo mitocondrial mediante la activación de las enzimas del ciclo de Krebs gracias a una

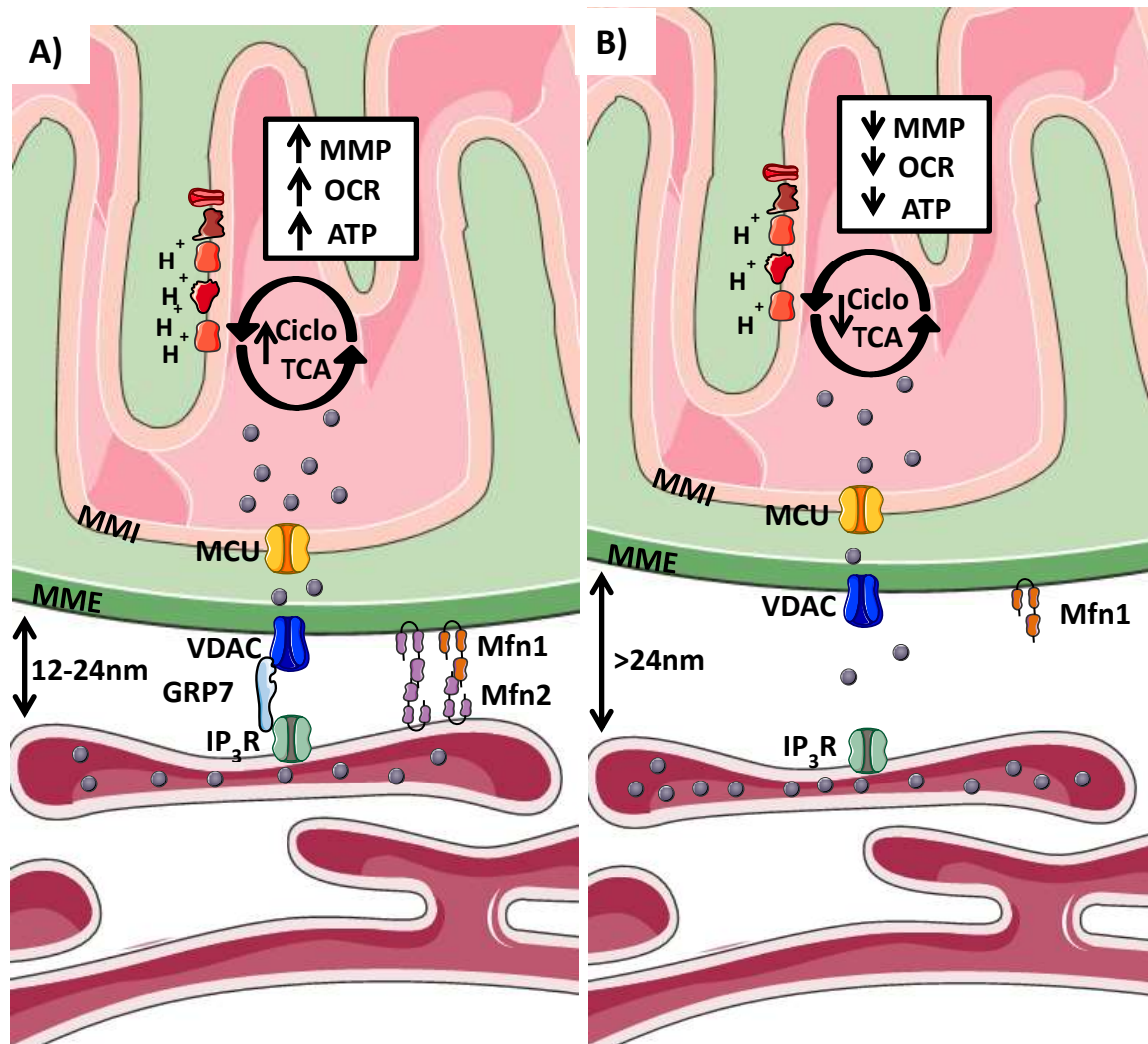


Figura 58. A) Modelo de regulación de la bioenergética mitocondrial en el cual gracias al papel enlazador de Mfn2, mitocondrias y RE se mantienen próximos facilitando la transferencia de Ca^{2+} hacia las mitocondrias, y activando en consecuencia la bioenergética mitocondrial. B) Ante la falta de Mfn2, la distancia entre MAMs se ve alterada, hecho que afecta negativamente la transferencia de Ca^{2+} y bioenergética mitocondrial.

mayor transferencia de Ca^{2+} a las mitocondrias en presencia de Mfn2, aunque no se observaron cambios en la bioenergética mitocondrial (Chen et al. 2012). Por otro lado, estudios realizados en fibroblastos embrionarios de ratón sometidos a condiciones de estrés de RE demostraron que en estas condiciones se potencia tanto el metabolismo

como la bioenergética mitocondrial, gracias a un mayor transferencia de Ca^{2+} a las mitocondrias en presencia Mfn2 (Bravo et al. 2011). Más recientemente, también en modelos de ratón pero sin someter a ningún tipo de estrés, se demostró que la eliminación de Mfn2 con una consiguiente alteración de la transferencia de Ca^{2+} a las mitocondrias afecta negativamente al potencial de membrana mitocondrial y la producción de ATP, sugiriendo así que este hecho regula de por sí la bioenergética mitocondrial (Seidlmayer et al. 2019).

No solo se ha relacionado a Mfn2 con la regulación de la bioenergética mitocondrial a través de la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias. También se ha descrito que Mfn2 regula el metabolismo mitocondrial a través de distintos mecanismos como son el aumento de proteínas de la cadena transportadora de electrones (Pich et al. 2005), la formación de súper complejos (Segalés et al. 2013) o la síntesis de coenzima Q (Mourier et al. 2015). Estos estudios no presentarían una postura contraria a los resultados mostrados en esta tesis, ya que estos mecanismos podrían estar influyendo en el metabolismo y bioenergética mitocondrial *downstream* de la regulación de los contactos RE-mitocondrias y el intercambio de Ca^{2+} entre ambos. Por ejemplo, la remodelación de las crestas mitocondriales en el hígado postprandial se produce a través de un mecanismo asociado a la unión RE-mitocondria mediante Mfn2 (Sood et al. 2014), mientras que las proteínas encargadas de la biosíntesis de coenzima Q se ensamblan en los contactos RE-mitocondrias (Subramanian et al. 2019).

2. Estudio de la interacción entre mitofusinas en la regulación de la bioenergética mitocondrial

La presencia de Mfn2 en el RE permite regular la dinámica reticular pero no la mitocondrial, mientras que la presencia de Mfn2 en la mitocondria tiene el efecto opuesto (de Brito & Scorrano 2008). En efecto, en esta tesis se determinó que solo la forma dirigida a las mitocondrias (Mfn2-mt) era capaz de modular su morfología, mientras que la forma dirigida al RE (Mfn2-RE) no. Mediante el uso de una línea doble *knockout* para ambas mitofusinas se observó que estas formas por sí solas tampoco restablecían los contactos entre mitocondrias y RE, hecho que coincide con los

resultados obtenidos en el estudio de *de Brito & Scorrano*, en los cuales solo se restablecían los contactos cuando las mitofusinas estaban presentes en ambos orgánulos (de Brito & Scorrano 2008). Cabe destacar que en presencia de Mfn1 en las mitocondrias, Mfn2-RE es capaz de reestablecerlos parcialmente, pero si en vez de Mfn1 lo que se expresaba en las mitocondrias es Mfn2, la recuperación era total. Se podría decir entonces que en este caso la función de Mfn1 no es tan eficiente, ya que las interacciones homotípicas entre Mfn2 son suficientes para reestablecer los contactos entre mitocondrias y RE a niveles similares a los de la línea WT, la cual expresa tanto Mfn1 como Mfn2 en las mitocondrias. De hecho, a diferencia de Mfn2, Mfn1 tampoco regula la morfología del RE (de Brito & Scorrano 2008; Muñoz et al. 2013), por lo que parece no tener un papel demasiado fundamental en la funcionalidad de este orgánulo. Por lo tanto, en la interacción entre mitocondrias y RE, la actividad de Mfn2 es más eficiente que la de Mfn1, a diferencia de la interacción entre mitocondrias, en las cuales es más importante y eficiente la actividad de Mfn1 para promover su fusión (Ishihara et al. 2004).

Según el mecanismo propuesto anteriormente (Fig.58), a partir de la regulación de los contactos por Mfn2, se facilita el transporte de Ca^{2+} y en consecuencia se activa la bioenergética mitocondrial. Los resultados obtenidos en esta tesis sirven para describir de manera más detallada el mecanismo por el cual Mfn2 regula el intercambio de Ca^{2+} entre orgánulos, y del cual se muestran evidencias en otros estudios (de Brito & Scorrano 2008; Seidlmayer et al. 2019; Tian & Zhang 2021). En este estudio, promoviendo un tipo u otro de interacción entre mitofusinas en células Mfn2KO y DKO, se consiguió restablecer de manera parcial o total la distancia en las MAMs respecto a los niveles mostrados por las células WT. Del mismo modo que en la distancia de las MAMs, la interacción heterotípica Mfn2-Mfn1 generaba una recuperación parcial en el transporte de Ca^{2+} y la bioenergética mitocondrial, mientras que promoviendo únicamente la interacción homotípica Mfn2-Mfn2, la recuperación era total. La explicación respecto a esta disparidad funcional en ambas interacciones podría ser la existencia de algún mecanismo de regulación que promoviera más un tipo u otro de interacciones para modular de esta forma la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias y la bioenergética mitocondrial. De esta manera podría actuar como

mecanismo adaptativo frente a distintas situaciones patofisiológicas en función las necesidades de la célula, como podría ser el caso del estrés del RE, la mitofagia o la apoptosis, en los que ya se ha descrito una modulación por parte de las MAMs (Bravo et al. 2011; Tagaya & Arasaki 2017; Wang et al. 2021).

Si bien se sabe que existe una pequeña fracción de Mfn2 que localiza en el RE (de Brito & Scorrano 2008) y puede ser detectada por ejemplo mediante *western blot* tras un proceso de aislamiento de las MAMs (Tubbs et al. 2014; Montesinos & Area-Gomez 2020), se desconoce aún el mecanismo por el cual esta fracción localiza en el RE. En consecuencia, tampoco hay conocimiento sobre por qué concretamente es Mfn2, y no Mfn1, la que se encuentra en el RE, y si Mfn1 no tiene un papel más importante en esta función simplemente por imposibilidades físicas o por cuestiones intrínsecas de la proteína. Las mitofusinas se consideran del tipo “multi-span” en vez de “tail-anchored” (TA), ya que poseen dos dominios transmembrana conectados por un pequeño bucle, en vez de uno (Rojo et al. 2002; Dukanovic & Rapaport 2011). No obstante, en diferentes experimentos se ha observado que su mecanismo de localización comparte similitudes con el de las TA, ya que el carácter poco hidrofóbico del dominio transmembrana y las cargas presentes en los aminoácidos de su secuencia C-terminal flanqueante, son esenciales para localizar a Mfn2 en las mitocondrias (Rojo et al. 2002). Además, modificando las propiedades de dichos aminoácidos se puede revertir su localización hacia el RE (Rojo et al. 2002).

Aunque todavía no se sabe del todo si existen receptores que estén involucrados en la inserción de proteínas TA en la MME, en proteínas *multi-span* sí es necesaria su presencia, tal como se demostró ya hace años en un ensayo con Fzo1, homóloga de Mfn2 en levadura (Rapaport et al. 1998). Tal como se ha comentado, hay proteínas, como el caso de Mfn2, que contienen características propias tanto de proteínas TA como *multi-span*. La idea de que las vías de importación de proteínas TA y *multi-span* pudieran encontrarse superpuestas, al menos parcialmente, cobra más sentido a raíz de ensayos competitivos realizados con los receptores mitocondriales PBR (del tipo *multi-span*) y la proteína Bak (del tipo TA). En estos ensayos, se observa una fuerte disminución en la importación de PBR hacia las mitocondrias frente a un aumento en la importación de Bak de manera dependiente de la translocasa Tom70, cuando éste

es sobreexpresado (Otera et al. 2007). De hecho, en este mismo estudio se demostró que Mfn2 podría integrarse a la MME de una manera similar a PBR, es decir, de manera dependiente de Tom70, pero no de otros componentes del complejo TOM o “translocasa de la membrana externa” (Otera et al. 2007). Por lo tanto, si existiera un solapamiento en las vías de importación debería ocurrir antes de la interacción con Tom70, ya que en ese momento mitofusina 2 se dirigiría hacia las mitocondrias. En el caso de existir cambios post-traduccionales o la formación de isoformas que dirigieran a Mfn2 hacia el RE, como ocurre típicamente en otras proteínas TA, debería darse antes de ese momento, para que fuera reconocido por una hipotética maquinaria de importación hacia el RE y no hacia las mitocondrias. Esta hipotética maquinaria podría tratarse de la vía GET, una vía típica de reconocimiento e importación de proteínas del RE, pero que también puede insertar en el RE de manera errónea proteínas mitocondriales frente a su sobreexpresión o enmascaramiento de la zona de aminoácidos que indica su localización mitocondrial (Vitali et al. 2018). Dado que estos aminoácidos clave en su localización están contenidos en la zona transmembrana (Rojo et al. 2002), se diseñaron unas formas de las mitofusinas las cuales tenían intercambiados los dominios transmembrana de una mitofusina a otra. Aunque la forma de Mfn1 con el dominio transmembrana de Mfn2 (Mfn1-TM2) no recuperaba la bioenergética mitocondrial, interesantemente la forma inversa (Mfn2-TM1) perdía su capacidad de reestablecerla. Este dominio pues, posiblemente esté relacionado con el mecanismo de localización al RE, ya que la localización en el RE es necesaria para la formación de MAMs y la consiguiente activación de la bioenergética mitocondrial, aunque sería necesario analizar la localización subcelular de Mfn2-TM1 antes de afirmarlo.

No obstante, éste es un mecanismo aún desconocido, y la explicación podría no residir en estas vías de importación de las proteínas TA, sino en algún mecanismo distinto, como por ejemplo mediante vesículas. Recientemente se han descubierto unas vesículas asociadas a ribosomas (RAVs) generadas en el RE y que interaccionan con las mitocondrias mediante contactos directos entre membranas (Carter et al. 2020). Aunque cabe pensar que en este caso concreto el mecanismo lógico sería una vesícula que se dirigiera en dirección opuesta, es decir, de mitocondrias a RE, el hecho de que

recientemente se sigan descubriendo nuevos posibles mecanismos de comunicación entre orgánulos, deja abierta la posibilidad de pensar en un mecanismo similar. Otro mecanismo que también podría encajar en este caso es mediante un cambio conformacional en la estructura proteica, regulado por modificaciones post-traduccionales. Este cambio de conformación puede favorecer un reclutamiento conmutable de proteínas, que además encaja perfectamente con la alta plasticidad de las MAMs a causa de su contenido lipídico (Ilacqua et al. 2017). Siguiendo con este mecanismo, existen evidencias de proteínas de membrana que se encuentran “secuestradas” en un compartimento subcelular y que cuando cambian su conformación se liberan y re-localizan a otros compartimentos, pudiendo de este modo regular también su funcionalidad (Bauer et al. 2015). Dada la gran cantidad de modificaciones post-traduccionales e interacciones con otras proteínas que presenta Mfn2 y que ayudan a regular sus distintas funciones (Ali & McStay 2018; Adaniya et al. 2019), no parece una idea demasiado descabellada pensar que estas modificaciones post-traduccionales, de una forma u otra, sean la clave de esta incógnita aún sin resolver. No obstante, todos estos mecanismos son hipotéticos y no hay evidencias sobre el direccionamiento de Mfn2 al RE, por lo que todavía no se puede hablar a ciencia cierta de cuál es el mecanismo por el cual exclusivamente Mfn2, y no Mfn1, también localiza en el RE.

Pese a que las mitofusinas son homólogas en sus dominios funcionales relevantes, tienen una identidad aproximadamente del 63% (Zorzano et al. 2010), por lo que una parte poco despreciable de su estructura presenta diferencias significativas. Por ejemplo, Mfn2 posee un dominio de unión a Ras (RBD) (Chen et al. 2004) y una región rica en prolinas (Zorzano et al. 2010), que no presenta Mfn1. En la presente tesis se observó cómo dirigiendo específicamente a Mfn1 al RE y promoviendo su unión con Mfn1 o Mfn2 mitocondriales, ésta no era capaz de restaurar las alteraciones de las MAMs ni la pérdida de bioenergética mitocondrial. Cabe destacar que mediante la interacción heterotípica clásica $Mfn2^{RE}-Mfn1^{mito}$, se promueve una mejoría en las MAMs y bioenergética mitocondrial, mientras que la interacción heterotípica alternativa $Mfn1^{RE}-Mfn2^{mito}$ no produce ningún tipo de efecto en ambos procesos. Por lo tanto, aunque no se conoce el mecanismo por el cual Mfn2 llega a la membrana del

RE, estos resultados sugieren que solo se encuentra Mfn2 en el RE porque es la única de las dos mitofusinas con capacidad de mediar este tipo de enlace entre ambos orgánulos. Un hecho interesante es que formas de Mfn2 sin el dominio de unión a Ras (RBD) son capaces de regular la morfología mitocondrial, pero no la morfología reticular o los contactos entre ambos orgánulos (de Brito & Scorrano 2008; Martins De Brito & Scorrano 2009). Esta podría ser una explicación de por qué la forma de Mfn1 dirigida al RE no puede restablecer las MAMs, ya que del mismo modo que el dominio RBD es fundamental para la dinámica reticular, también podría serlo para establecer los contactos entre mitocondrias y RE. Además, se han descrito proteínas que interactúan específicamente con Mfn2, pudiendo modular su función (Sugiura et al. 2013; Basso et al. 2018), por lo que no sería extraño pensar en este mecanismo teniendo en cuenta que solo Mfn2 presenta un dominio rico en prolinas que está implicado en interacciones proteína-proteína (Zorzano et al. 2010). Por otro lado, dado al amplio interactoma que se conoce en Ras (Bueno et al. 2016; Kovalski et al. 2019) y las diferentes cascadas de señalización que se desencadenan a partir de su activación (Simanshu et al. 2017), surge la pregunta de si las MAMs están reguladas por uno de estos mecanismos a través del dominio RBD de Mfn2. Por ejemplo, se sabe que la proteína ERK, presente en una de sus cascadas de señalización, se encuentra sobreactivada cuando se elimina Mfn2, aunque la manipulación genética y farmacológica de dicha cascada, indica que no parece estar implicada en los contactos RE-mitocondria (Martins De Brito & Scorrano 2009). No obstante, la sobreexpresión de una forma de Mfn1 con el dominio RBD no pudo restablecer el déficit bioenergético en células Mfn2KO, por lo que no parecía ser el dominio encargado de la regulación de las MAMs por parte de Mfn2. Como el dominio transmembrana parecía influir de algún modo en el restablecimiento de la bioenergética mitocondrial, se diseñó una Mfn1 que combinaba el dominio transmembrana de Mfn2 con el dominio RBD de la misma, pero tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios. Por lo tanto, si el dominio RBD está implicado en este mecanismo, no lo lleva a cabo por sí solo y debe estar implicado otro dominio distinto al transmembrana. No obstante, es necesario continuar con esta línea de investigación con el fin de encontrar evidencias más relevantes sobre la potencial implicación del dominio RBD en este mecanismo.

Siguiendo una estrategia similar, se diseñaron otras formas las cuales eran deficientes en ciertos dominios. Mediante el uso de estas formas se confirmó la importancia fundamental de la presencia de los dominios GTPasa y HR1 en la bioenergética mitocondrial, tal y como se ha descrito anteriormente en el mecanismo de interacción entre mitofusinas (Huang et al. 2011; Franco et al. 2016; Qi et al. 2016; Cao et al. 2017; Mattie et al. 2018; Cohen & Taresté 2018). No obstante, el dominio HR1 no parece ser clave para determinar que sea exclusivamente Mfn2 la que realice estas funciones, y no Mfn1. Por otro lado, se usó una forma de Mfn2 citoplasmática sin dominio transmembrana ni HR2, la cual ya ha sido descrita que estimula el metabolismo mitocondrial sin alterar su fusión (Segalés et al. 2013). Del mismo modo que en el estudio de *Segalés et al.*, en nuestro trabajo esta forma también permite activar la bioenergética mitocondrial, pero solo en presencia de Mfn2 endógena y no en células Mfn2KO. Cabe destacar que en ninguna otra sobreexpresión de cualquiera de las otras formas de mitofusinas utilizadas en esta tesis se ha observado un aumento significativo en la bioenergética mitocondrial de las células WT, ni siquiera sobreexpresando ChiMERA. Este fenómeno se puede observar también en un estudio realizado en células del músculo esquelético sanas, donde sobreexpresar Mfn2 no tiene tampoco ningún efecto sobre la bioenergética mitocondrial (Lally et al. 2013). Una explicación para este fenómeno podría ser la existencia de un mecanismo de control que evite una captación excesiva de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias a causa de un exceso de formación de MAMs, lo cual podría conducir a la célula a procesos de muerte celular (Di Lisa et al. 2011), y que de algún modo las formas de mitofusina citoplasmáticas evaden. Esta sería una explicación bastante razonable, pues existen muchos mecanismos regulatorios encargados justamente de evitar una captación excesiva de Ca^{2+} mitocondrial, como por ejemplo la fosforilación y desfosforilación reversible de los canales IP_3R (Vanderheyden et al. 2009), la regulación de los canales responsables del intercambio de Ca^{2+} mediante múltiples interacciones con otras proteínas (Rochin et al. 2019; Carreras-Sureda et al. 2019; Rosencrans et al. 2021) o la degradación de las proteínas implicadas en el proceso (Hirota et al. 1999), entre otros.

Hace años se propuso un modelo en el cual las mitofusinas formaban oligómeros mediante sus dominios GTPasa, los cuales potenciaban sus interacciones (Franco et al.

2016). Del mismo modo, se ha demostrado la interacción entre los dominios HR1 y HR2 mediante sus regiones *coiled-coil* (Huang et al. 2011; Franco et al. 2016), por lo podría ser posible que dominios HR1 de diferentes mitofusinas, pero del mismo orgánulo, también interaccionaran entre sí a través de esta región. Ésta podría ser la explicación que diera respuesta a la estimulación bioenergética producida por la forma citoplasmática, la cual no tiene ni dominio transmembrana ni HR2. De hecho, la sobreexpresión únicamente del dominio HR1 de Mfn2, o su forma corta, también producía el mismo efecto potenciado en la bioenergética mitocondrial. Así pues, atendiendo a estos resultados es más plausible que la estabilización de las interacciones se dé mediante el dominio HR1, y no a través de la GTPasa. Esta posibilidad se valoró co-expresando esta forma citoplasmática o el dominio HR1 con Mfn2-RE en células Mfn2KO, lo cual permitía un restablecimiento total de la bioenergética mitocondrial, pese a promover únicamente interacciones heterotípicas. Aunque estos resultados sugieren que la interacción entre regiones *coiled-coil* de los dominios HR1/2 de diferentes mitofusinas conferiría una mayor robustez en sus interacciones, hace falta llevar a cabo una investigación más exhaustiva de este mecanismo para poder enunciar conclusiones con mayor solidez.

En relación a esto, cabe destacar que las formas de Mfn2 y Mfn1 dirigidas exclusivamente a RE (Mfn2-RE) o mitocondrias (Mfn2-mt) tampoco tienen dominio HR2, sino que se ha sustituido por una secuencia de anclaje a estos orgánulos. El hecho de que a pesar de no tener dominio HR2 consigan reestablecer la distancia de las MAMs, el transporte de Ca^{2+} y la bioenergética mitocondrial, encaja con los nuevos modelos propuestos de interacción entre mitofusinas. En estos modelos, se propone que el dominio que dirige la interacción entre mitofusinas es el GTPasa (Qi et al. 2016; Cao et al. 2017; Mattie et al. 2018), y no el HR2 como se propuso originalmente en los primeros estudios de interacciones entre mitofusinas, y que se acepta de manera clásica (Chen et al. 2003; Koshiba et al. 2004). Por otro lado, y aunque son necesarios más estudios al respecto, la interacción entre dominios HR1 y HR2 de una misma mitofusina permite adoptar una conformación inactiva o activa en función de si estos están interaccionando o no, respectivamente (Huang et al. 2011; Franco et al. 2016). Mediante este mecanismo pues, las mitofusinas estarían expuestas a una regulación

muy precisa de su función estructural, seguramente por interacción con otras proteínas o modificaciones post-traduccionales, como se han descrito en otros procesos (Misko et al. 2010; Sugiura et al. 2013; Basso et al. 2018). Al no tener dominio HR2, la sobreexpresión de estas formas dirigidas (Mfn2-RE, Mfn2-mt y Mfn1-RE) en esta tesis produciría *a priori* unas mitofusinas que están siempre activas. Si fuera así, por consiguiente, en los efectos observados al utilizar dichas formas se perdería parte de la información respecto al mecanismo íntegro de interacción y su regulación, ya que ésta no es posible. Por otro lado, un modelo de topología propuesta recientemente define que el dominio HR2 se sitúa en el espacio intermembrana de la mitocondria permitiendo la oligomerización de las mitofusinas e interacción con otras proteínas (Mattie et al. 2018). Si este fuera el caso, y no el modelo de topología clásico en los cuales los dominios GTPasa, HR1 y HR2 están encarados todos hacia el citoplasma (Rojo et al. 2002), igualmente estas mitofusinas serían funcionales, pero también se perdería información sobre el mecanismo de interacción entre mitofusinas y su regulación.

3. La función enlazadora de Mfn2 promueve el crecimiento neurítico mediante su control de la bioenergética mitocondrial

El crecimiento neurítico es un proceso clave durante el desarrollo neuronal (Semple et al. 2013). En cultivos primarios neuronales, durante los días 3 y 7 tras la siembra (DIV3-7) se produce la mayor parte del crecimiento neurítico (Dotti et al. 1988). Con tal de sustentar la formación de estas nuevas proyecciones son necesarias grandes cantidades de energía, motivo por el cual el número de mitocondrias aumenta durante la diferenciación neuronal y su maduración (Cheng et al. 2012). Por otro lado, en células de Purkinje, un tipo de neurona GABAérgica localizada en el cerebelo, se ha demostrado *in vivo* que Mfn2, pero no Mfn1, es necesaria para el crecimiento neurítico, la formación de espinas dendríticas y la supervivencia neuronal (Chen et al. 2007). Estos hechos van en consonancia con nuestros resultados, ya que a lo largo de los días de mayor crecimiento neurítico se observó un aumento en la expresión de

Mfn2 y en la masa mitocondrial, mientras que la expresión de Mfn1 se mantuvo constante. Además, de manera concomitante se observó también un aumento de los contactos entre mitocondrias y RE. Aunque hay pocos estudios hasta la fecha que relacionen MAMs y desarrollo neuronal, nuestras observaciones complementan los resultados obtenidos en los mismos. Concretamente, en ellos se estudia la relación de Grp75, el enlazador de los canales de Ca^{2+} IP₃R y VDAC, con el crecimiento neurítico. En uno de ellos, tras activar el receptor β de ácido retinoico, de una vía de señalización relacionada con la regeneración neurítica, se observa un aumento en las MAMs, específicamente en los terminales neuríticos, y un aumento de colocalización entre Grp75 y mitocondrias (Trigo et al. 2019). En el otro, tras realizar una axotomía (corte que produce la ruptura del el axón) se observa un elevado movimiento de mitocondrias y ER hacia el lugar de la lesión, así como una mayor colocalización de ambos, hecho que indica un aumento en las MAMs. Además, también se observa una mayor expresión de Grp75 en la zona, y se comprueba su relación directa con un aumento en la captación de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias, así como un aumento de la producción de ATP y en definitiva, una mayor regeneración axonal (Lee et al. 2019). De este modo, queda patente el potencial de que las MAMs jueguen un papel importante durante el desarrollo neuronal, aunque es necesario dilucidar los mecanismos y procesos por los cuales lo lleva a cabo.

Además, el hecho de que estos últimos años se haya relacionado ampliamente alteraciones en las MAMs con distintas patologías neurológicas como la enfermedad de Alzheimer (Schon & Area-Gomez 2013; Tambini et al. 2016), la esclerosis lateral amiotrófica con demencia frontotemporal asociada (Prause et al. 2013; S. Watanabe et al. 2016; Stoica et al. 2016) la enfermedad de Parkinson (Calì et al. 2013; Gautier et al. 2016) o la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (Bernard-Marissal et al. 2019; Larrea et al. 2019), confirma la idea de que estos dominios especializados realizan funciones fundamentales en las neuronas.

La supresión de Mfn2 durante los días de crecimiento neurítico en neuronas Mfn2KO inducibles por tamoxifeno, provocó una disminución en los contactos RE-mitocondrias y en la bioenergética mitocondrial, sin alterar la masa mitocondrial. Asimismo, otros estudios han demostrado también que la pérdida de Mfn2 afecta negativamente la

bioenergética mitocondrial, por ejemplo durante el proceso de sinaptogénesis (Fang et al. 2016), la formación de proyecciones axonales en neuronas dopaminérgicas (Lee et al. 2012) o el desarrollo neurítico en células de Purkinje (Chen et al. 2007), aunque en este último caso se correlaciona con defectos en el ADN mitocondrial. Tal y como se ha observado en MEFs, la sobreexpresión del enlazador artificial ChiMERA o las diferentes formas de Mfn2 dirigidas a RE o mitocondrias, también permiten reestablecer la colocalización RE-mitocondrias y el MMP en neuronas. En este modelo experimental, de nuevo solo se restablece parcialmente las MAMs y la bioenergética mitocondrial en presencia de Mfn2 en el RE, siendo también más eficiente la interacción homotípica entre Mfn2, la cual recupera totalmente las alteraciones observadas.

Durante los primeros días de vida, el encéfalo de los ratones aún está desarrollándose (Semple et al. 2013). Por lo tanto, el desarrollo neuronal y crecimiento neurítico durante este periodo es crítico para el correcto desarrollo del encéfalo. En nuestro modelo de ratón transgénico *in vivo* se observan defectos en la ramificación neurítica y en la densidad y longitud de las espinas dendríticas en crías P13, tras la inyección seriada de tamoxifeno en sus primeros días de vida, es decir, durante el periodo de crecimiento neurítico. Por lo tanto, se observan alteraciones en el crecimiento neurítico y desarrollo de las espinas dendríticas frente la ausencia específica de Mfn2, del mismo modo que ocurre en células de Purkinje, cuando Mfn2 es eliminada a mediados de la gestación (Chen et al. 2007). A su vez, en nuestros cultivos neuronales Mfn2KO *in vitro* también se observa una reducción en la longitud total y ramificación neurítica. No obstante, promoviendo la unión de las MAMs mediante la sobreexpresión de distintas construcciones como son ChiMERA, la forma *wild-type* de Mfn2 y la combinación de las formas de Mfn2 dirigidas a RE y mitocondrias, es posible corregir los defectos en el crecimiento neurítico. Tal y como se ha comentado, la aportación de grandes cantidades de energía en forma de ATP por parte de las mitocondrias es un proceso fundamental para el desarrollo neuronal (Cheng et al. 2012). Si las mitocondrias no están funcionalmente activas se ve alterado el estado fisiológico y funcional de la neurona (Calkins et al. 2011), hecho que afecta negativamente al crecimiento neurítico (Mattson & Partin 1999; Nguyen et al. 2018), pudiendo llegar a acontecer procesos patológicos como consecuencia (Zsurka & Kunz

2015). Por lo tanto, el hecho de que tras la supresión de la expresión de Mfn2 se observe de manera concomitante una disminución en la bioenergética mitocondrial y un menor crecimiento neurítico, parece estar directamente relacionado, tal como se demuestra en diferentes modelos comentados anteriormente (Chen et al. 2007; Lee et al. 2012; Fang et al. 2016). De este modo, el paralelismo de estos resultados con los resultados obtenidos en el estudio realizado en MEFs sugiere que Mfn2 regula la distancia entre MAMs a través de su función enlazadora, permitiendo activar a través del transporte de Ca^{2+} la bioenergética mitocondrial, y por lo tanto, sustentar el crecimiento neurítico.

Otro de los procesos que se ha descrito ampliamente que es clave, no solo durante el desarrollo neuronal, sino también en procesos neuropatológicos, es la dinámica mitocondrial (Chen et al. 2003; Chan 2006; Chen & Chan 2006; Chen et al. 2007; Baloh et al. 2007; Bereiter-Hahn 2014). Sorprende por tanto el hecho de que pese a presentar una morfología claramente fragmentada, en neuronas Mfn2KO haya sido posible restablecer el crecimiento neurítico de manera independiente a la dinámica mitocondrial. Del mismo modo que en MEFs, sobreexpresando una forma dirigida de Mfn2 a mitocondrias, la cual permite recuperar su función de fusión mitocondrial, no se pudo recuperar la bioenergética mitocondrial. Estos resultados van en consonancia con los resultados descritos en un estudio de fibroblastos de pacientes de la enfermedad CMT2A, en la cual se observan alteraciones en la bioenergética mitocondrial, pero no en la morfología mitocondrial (Loiseau et al. 2007). Por lo tanto, en un contexto fisiológico neuronal también existen evidencias de una independencia entre los procesos de dinámica y bioenergética mitocondrial. Otro argumento que refuerza esta idea es en el caso del transporte mitocondrial, el cual está estrechamente relacionado con la dinámica mitocondrial (Chen & Chan 2006; Rintoul & Reynolds 2010; Jung et al. 2016). En este caso, cuando se elimina tanto Mfn2 como Opa1 se observan unos mayores niveles de fragmentación mitocondrial parecidos en ambos casos, pero solo se observa alteración en el transporte mitocondrial eliminando Mfn2, y no Opa1 (Misko et al. 2010). Estos resultados sugieren que, los defectos perjudiciales observados en la fisiología neuronal frente a alteraciones en la dinámica mitocondrial, en realidad tal vez impliquen otros procesos en los que Mfn2 estaría

involucrada, como por ejemplo la regulación de las MAMs, hecho que correlacionaría con los resultados mostrados en este trabajo durante el desarrollo neuronal *in vitro*. Dado que Mfn1 es más eficiente que Mfn2 en la fusión mitocondrial (Chen et al. 2003), si las alteraciones en la dinámica mitocondrial fueran la causa principal, cabría esperar, por ejemplo, que fuera Mfn1 la proteína necesaria para el desarrollo *in vivo* de las células de Purkinje (Chen et al. 2007), la formación de proyecciones axonales en neuronas dopaminérgicas (Lee et al. 2012) o que mutaciones en Mfn1 causaran la enfermedad de CMT2A (Züchner et al. 2004), y no al contrario, tal y como ocurre. Así pues, podría ser que los defectos observados en la dinámica mitocondrial no fueran la causa fundamental de estos procesos neuropatológicos ocurridos durante el desarrollo neuronal o en la enfermedad de CMT2A, sino una de las consecuencias producidas por el mal funcionamiento de Mfn2. No obstante, no hay que descartar tampoco que la dinámica mitocondrial también pueda tener algún tipo de implicación en estos trastornos. Sea como sea, este es un tema que se debe seguir investigando ya que se presenta muy complicado dadas las interconexiones o discrepancias que existen entre las diferentes funciones mitocondriales, la compleja fisiología neuronal y Mfn2.

Por otro lado, las MAMs son un importante regulador de la homeostasis del Ca^{2+} tanto en células neuronales como no neuronales (Rizzuto et al. 2012). Consiguientemente, alteraciones en los contactos RE-mitocondrias producen fuertes efectos en la fisiología neuronal. Por ejemplo, la eliminación del enlazador PDZD8 causa perturbaciones en la dinámica del Ca^{2+} en las dendritas (Hirabayashi et al. 2017), siendo la morfogénesis y maduración de las mismas es un proceso fundamental en el desarrollo del SNC, ya que afectan directamente al establecimiento de las habilidades cognitivas (Mauceri et al. 2011). De manera similar, la proteína DISC1, ligada a déficits cognitivos y emocionales, se encuentra en las MAMs y modula el intercambio de Ca^{2+} mediante su interacción con IP_3R (Park et al. 2017). En procesos de regeneración neurítica también se ha observado una mayor colocalización de proteína Grp75, el enlazador del complejo de transporte de Ca^{2+} IP_3R -VDAC, en mitocondrias, así como un aumento de captación de Ca^{2+} por las mismas (Lee et al. 2019; Trigo et al. 2019). En consonancia con estos estudios, aquí se propone que el transporte de Ca^{2+} es esencial para el crecimiento neurítico, gracias al papel enlazador de Mfn2 que facilitaría su transporte. Aunque en

esta tesis no se ha estudiado específicamente el intercambio de Ca^{2+} entre RE y mitocondrias en neuronas ante la falta de Mfn2, sí que se observaron alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} en modelos neuronales *knockdown* de Mfn2, en resultados obtenidos en la tesis doctoral de un antiguo miembro del grupo de investigación (Martorell-Riera 2015). Estos resultados, encajan perfectamente con el mecanismo descrito en el estudio realizado en MEFs que se presenta en esta tesis.

Durante la actividad sináptica entra gran cantidad de Ca^{2+} hacia el citoplasma de manera transitoria, donde realiza funciones fundamentales para la fisiología neuronal, como es principalmente la liberación de neurotransmisores (Südhof 2012), pero también la estimulación de la respiración mitocondrial o la activación de gran variedad de cascadas de señalización (Rueda et al. 2016). La actividad sináptica promueve el crecimiento neurítico (Segarra-Mondejar et al. 2018), así como éste requiere grandes cantidades de energía para promover las vías anabólicas que conllevan la síntesis la nueva biomasa necesaria (Son & Han 2018). En las neuronas Mfn2KO se observó que la entrada de Ca^{2+} transitoria relacionada con la actividad sináptica estaba alterada. Las neuronas han desarrollado amplios y complejos mecanismos de señalización por Ca^{2+} mediante los cuales realizan sus funciones fisiológicas (Brini et al. 2014). Además, tanto RE como mitocondrias están directamente implicados en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} frente a la entrada transitoria de Ca^{2+} a través de la actividad sináptica (Rueda et al. 2016). Es por eso, que en neuronas es particularmente importante la captación de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias, no solo para activar su bioenergética mitocondrial sino para facilitar la homeostasis del Ca^{2+} , incluso pudiendo modular de esta manera la respuesta sináptica (Li et al. 2004). Por lo tanto, alteraciones en las MAMs pueden afectar de manera crítica la fisiología neuronal, hecho que se relacionan con diferentes trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, entre otras (Area-Gomez et al. 2012; Krols et al. 2016; Stoica et al. 2016).

En relación al RE, su morfología es fundamental para la arquitectura neuronal (Cui-Wang et al. 2012). Las neuritas dependen del RE para almacenar el Ca^{2+} e incluso modular la señalización sináptica (Holbro et al. 2009), además de suplementar a la neurona de lípidos para generar las nuevas membranas durante el desarrollo neuronal

(Renvoisé & Blackstone 2010). Aunque el RE se extiende por todos los puntos de la compleja morfología neuronal, todo el RE comparte el mismo lumen, hecho que le permite actuar como una especie de centro de control de los diferentes eventos que están ocurriendo a lo largo de toda la neurona (Myoung Kyu Park et al. 2008). Dadas las importantes funciones que realiza el RE durante el desarrollo neuronal, no parece extraño que suprimiendo la expresión de proteínas que regulan la dinámica reticular, se produzca un menor crecimiento neurítico (Shim et al. 2008; K. Watanabe et al. 2016). Como ya se ha comentado anteriormente, la fracción de Mfn2 que localiza en el RE también es capaz de regular su morfología con un importante papel del dominio RBD (Martins De Brito & Scorrano 2009). Por lo tanto, dado que en neuronas la dinámica reticular parece ser particularmente importante, la fracción de Mfn2 localizada en el RE, en este caso también podría estar jugando un doble papel, siendo de igual importancia también para el crecimiento neurítico a través del mantenimiento de la morfología reticular. No obstante, el hecho de que la interacción heterotípica mejore solo parcialmente el crecimiento neurítico pese a sobreexpresar Mfn2 en el RE, denota una mayor repercusión de los contactos RE-mitocondrias que de su propia dinámica, en este proceso.

4. La función enlazadora de Mfn2 parece modular el reclutamiento de Bax en las mitocondrias frente a un insulto excitotóxico

Debido a la gran cantidad de funciones en las cuales mitofusina 2 participa y a las implicaciones de éstas en la fisiología celular, parece claro el potencial impacto que puede tener esta proteína en diferentes condiciones patológicas. La sobreexpresión de Mfn2 protege a las neuronas frente diferentes tipos de lesiones neuronales como son daño en el ADN, estrés oxidativo o privación de iones K^+ (Jahani-Asl et al. 2007) o en modelos *in vivo* tratados con neurotoxinas (Zhu et al. 2017; Zhao et al. 2021). Además, también se sabe que la falta de Mfn2 por sí sola induce una mayor muerte neuronal, tanto durante su desarrollo como en modelos murinos adultos *in vivo*, paralelamente a la aparición de una morfología mitocondrial altamente fragmentada (Jahani-Asl et al.

2007; Chen et al. 2007; Martorell-Riera et al. 2014; Han et al. 2020). De manera interesante, también se ha demostrado que el uso de un mutante de Mfn2 constitutivamente activo producía un efecto similar en la recuperación de la morfología mitocondrial, pero poseía una mayor capacidad neuroprotectora (Jahani-Asl et al. 2007), hecho que sugiere que realmente podría estar implicado una función alternativa a la dinámica mitocondrial. Una posibilidad podría ser la interacción directa de Mfn2 con proteínas de la familia Bcl2, descrita desde ya hace años y que en un principio se relacionaba con la dinámica mitocondrial (Karbowski et al. 2002; Neuspiel et al. 2005). En efecto, años más tarde se confirmó la relación entre Bax y la regulación de la fusión mitocondrial, concretamente a partir de las interacciones homotípicas Mfn2-Mfn2, es decir, independientemente de Mfn1 (Hoppins et al. 2011). Actualmente se sabe que también existen interacciones diferenciales de las mitofusinas 1 y 2 con otras proteínas de la familia Bcl2 como Bak o Bcl-XL (Du et al. 2021), pero el funcionamiento del mecanismo y cómo influye en el avance de la apoptosis todavía se desconoce.

Resultados previos del grupo de investigación realizados en modelos de excitotoxicidad, mostraron que tras la reducción específica de los niveles de Mfn2 aparecían alteraciones en la homeóstasis del Ca^{2+} , el potencial de membrana mitocondrial y un aumento en la translocación de Bax hacia las mitocondrias (Martorell-Riera et al. 2014). Estos fenómenos acontecidos en las neuronas conllevaban finalmente la muerte de las mismas mediante un proceso tardío de apoptosis de manera dependiente de las mitocondrias (Ankarcrona et al. 1995; D'Orsi et al. 2012; Martorell-Riera et al. 2014).

En esta tesis se pudo comprobar como sobreexpresando Mfn2 durante el insulto excitotóxico se reducían los niveles de reclutamiento de Bax hacia las mitocondrias, de acuerdo a lo que se ha observado en otros estudios (Neuspiel et al. 2005; Jahani-Asl et al. 2007; Martorell-Riera et al. 2014). Interesantemente, se observaba el mismo efecto cuando se sobreexpresaba el enlazador artificial ChiMERA, el cual actúa de manera independiente de la fusión mitocondrial. Estos resultados podrían ser explicados por dos mecanismos distintos, en los cuales la sobreexpresión de Mfn2 conferiría neuroprotección a través de la regulación de las MAMs frente a un insulto excitotóxico.

El primero de ellos consiste en evitar la crisis energética acontecida en la excitotoxicidad tardía, ya que a parte de los resultados previos del grupo (Martorell-Riera et al. 2014), existen otras evidencias de la aparición de alteraciones en la bioenergética mitocondrial en esta situación fisiopatológica, que finalmente conllevan la muerte neuronal. Por ejemplo, se ha descrito una disminución en los niveles de ATP y MMP de manera concomitante a un insulto excitotóxico con NMDA, pero cuando éste cesaba, ambos parámetros se restablecían (Connolly et al. 2014). A las 2-3 horas tras el insulto, de nuevo se observaba una caída dramática en los niveles de ATP y MMP (Connolly et al. 2014; Connolly & Prehn 2015), coincidiendo con el inicio del proceso de apoptosis tardía. Por otro lado, en modelos de ratón de la enfermedad de Gaucher, de tipo neurodegenerativo, frente a concentraciones fisiológicas de glutamato se produce la entrada masiva de Ca^{2+} a las neuronas, del mismo modo que ocurre en eventos excitotóxicos. Interesantemente en estos modelos también se observa una despolarización de la MMP y una disminución en los niveles de ATP en respuesta al glutamato, pero no en condiciones de reposo (Plotegher et al. 2020). Finalmente, también tras 3 horas de la aplicación de NMDA, en otro estudio se observaron alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} , que no aparecían en modelos deficientes en Bax (D'Orsi et al. 2015), hecho que sugiere que el reclutamiento de Bax hacia las mitocondrias podría estar estimulando la alteración de la homeostasis de Ca^{2+} neuronal.

Por otro lado, el segundo mecanismo que podría explicar la disminución de Bax en las mitocondrias tras promover los contactos RE-mitocondria es una mayor presencia de proteínas antiapoptóticas en las mitocondrias, que eviten la formación de oligómeros de Bax en las mismas. De hecho, en levadura se ha descrito la relación directa entre las MAMs y el reclutamiento de Bax, concretamente a través de la proteína MDM34 (Légitot et al. 2019), una de las cuatro proteínas que forman el complejo ERMES, encargado de estabilizar las MAMs. En este estudio, frente a la eliminación de MDM34 las MAMs se veían alteradas, aunque apenas se producían defectos en su viabilidad o morfología mitocondrial, contrariamente a la eliminación de los otros tres componentes de ERMES. No obstante, esta alteración en las MAMs afectaba al reclutamiento de Bax hacia las mitocondrias desde el RE durante la apoptosis, y a la

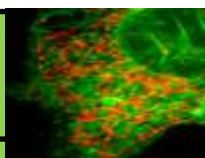
posterior liberación de citocromo c. Aunque el funcionamiento de las MAMs en este modelo es mucho más simplificado que en las células de mamíferos superiores, este estudio sugiere una regulación de Bax de manera dependiente de las MAMs, de acuerdo a los resultados observados en nuestro estudio.

Más recientemente, esta relación también se ha confirmado en un modelo de células de glioma, pero con la proteína Bcl2, también englobada en la misma familia que Bax, pero a diferencia de ésta, de carácter anti-apoptótico. Bcl2 se encuentra principalmente en membranas subcelulares, sobretodo del RE, donde también está implicada en la respuesta al estrés del RE (Pihán et al. 2017). En este modelo, ante la inducción de la apoptosis Bcl2 se dirige hacia las mitocondrias desde el RE gracias a la interacción con la proteína mitocondrial TOM20 (Lalier et al. 2021). Mediante interacciones directas, Bcl2 inhibe la formación de oligómeros de Bax y Bak, los cuales generan la permeabilización de la MME y el inicio de un proceso de muerte celular a través de la formación de poros (PTPm) (Westphal et al. 2014). Por lo tanto, analizando en un futuro el reclutamiento de Bcl2 hacia las mitocondrias al modular las MAMs, se podría determinar si existe la posibilidad de que la proximidad de las MAMs facilite la presencia de Bcl2 en las mitocondrias y en consecuencia, se confiriera protección frente a la formación de oligómeros de Bax y Bak.

Por otro lado, la sobreexpresión únicamente del dominio HR1 de Mfn2, o su versión reducida, también fue capaz de reducir los niveles de reclutamiento de Bax a las mitocondrias. Tal como se ha comentado anteriormente, una posibilidad es que la interacción con los dominios HR1 y HR2 de otras mitofusinas establezcan las interacciones. Dado que en el modelo utilizado no se ha eliminado la expresión de Mfn1 ni Mfn2 completamente, esta podría ser una explicación aceptable. Además, estos resultados muestran una potencial herramienta terapéutica frente a lesiones cerebrales agudas, como la isquemia, en las cuales gran cantidad de neuronas mueren de manera tardía por apoptosis a raíz de eventos excitotóxicos (Broughton et al. 2009). Dado la gran dificultad de conferir protección en las neuronas que mueren por necrosis de manera temprana en las zonas más afectadas por la isquemia, esta zona de muerte tardía se postula como una buena diana terapéutica para mitigar al máximo posible los efectos de la lesión aguda. Como en modelos *in vivo* de isquemia

disminuyen los niveles de Mfn2, pero no totalmente (Martorell-Riera et al. 2014), la idea sería conferir neuroprotección potenciando las cantidades restantes de Mfn2. En esta situación, el tratamiento con un péptido que pudiera reforzar las interacciones entre mitofusinas en las MAMs, *a priori* podría ayudar a mitigar el avance de la apoptosis. Para ello, es necesario determinar la región concreta de las mitofusinas que promueve la potenciación de las interacciones. Dado que la excitotoxicidad ha sido estrechamente relacionada con las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson o de Huntington (Lewerenz & Maher 2015; Mattson 2019), y Mfn2 también parece estar implicada en las mismas en diferentes maneras, esta proteína no solo se postula como una potencial diana terapéutica contra la excitotoxicidad, sino también en las distintas enfermedades neurodegenerativas en las cuales está presente. No obstante, estos son unos resultados muy preliminares que se deben complementar con una investigación mucho más exhaustiva, debido a la complejidad de la hipótesis realizada y su aplicación terapéutica.

CONCLUSIONES



A raíz de los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo, se pudieron enunciar las siguientes conclusiones, en función de los objetivos propuestos inicialmente.

En el estudio de la regulación de la bioenergética mitocondrial por Mfn2 se concluye:

1. La falta de Mfn2 afecta negativamente la bioenergética mitocondrial de manera independiente a la fusión mitocondrial.
2. El estrés del RE y la mitofagia no parecen ser el mecanismo principal por el cual Mfn2 regula la bioenergética mitocondrial.
3. Mfn2 actúa como enlazadora entre RE y mitocondrias.
4. La falta de Mfn2 reduce la formación de los contactos óptimos para la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias, alterando la homeostasis de Ca^{2+} en RE y mitocondrias, así como el transporte de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias.
5. La función enlazadora de Mfn2 promueve la bioenergética mitocondrial y la estimulación de enzimas implicadas en su metabolismo a través de la transferencia de Ca^{2+} del RE a las mitocondrias.

En el análisis de las interacciones entre mitofusinas se concluye:

6. La presencia de Mfn2 en el RE es esencial para regular la bioenergética mitocondrial mediante la interacción con mitofusinas mitocondriales.
7. Las interacciones homotípicas tienen una mayor implicación funcional que las heterotípicas en los contactos RE-mitocondrias.
8. La presencia de Mfn1 en el RE no permite regular la bioenergética mitocondrial.
9. Las interacciones entre mitofusinas podrían verse potenciadas por una hipotética estabilización de los contactos a través de sus dominios HR1.

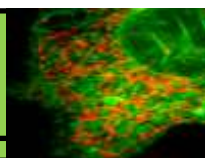
En la implicación de la regulación de la bioenergética mitocondrial por Mfn2 en el desarrollo neuronal se concluye:

10. Mfn2 juega un papel importante en el aumento de contactos RE-mitocondrias producido durante el desarrollo neuronal.
11. La formación de contactos a través de Mfn2 permite un correcto crecimiento neurítico.
12. La falta de Mfn2 afecta negativamente la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas en ratones postnatales y adultos.
13. La falta de Mfn2 afecta negativamente la actividad sináptica.

En el estudio del carácter neuroprotector de Mfn2 durante eventos excitotóxicos se concluye:

14. La función enlazadora de Mfn2 reduce el reclutamiento de Bax hacia las mitocondrias durante eventos excitotóxicos, de manera independiente a la fusión mitocondrial.
15. El reclutamiento de Bax hacia las mitocondrias puede regularse potenciando las interacciones existentes a partir de la hipotética estabilización de los contactos por HR1.

BIBLIOGRAFÍA



- Adaniya, S.M. et al., 2019. Posttranslational modifications of mitochondrial fission and fusion proteins in cardiac physiology and pathophysiology. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 316(5), pp.C583–C604.
- Agostini, M. et al., 2016. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death & Differentiation*, 23(9), pp.1502–1514.
- Akopian, D. et al., 2013. Signal recognition particle: An essential protein-targeting machine. *Annual Review of Biochemistry*, 82, pp.693–721.
- Alberts, B. et al., 2014. *Molecular Biology of the Cell*.
- Ali, S. & McStay, G.P., 2018. Regulation of mitochondrial dynamics by proteolytic processing and protein turnover. *Antioxidants*, 7(1).
- Alivisatos, A.P. et al., 2012. The brain activity map project and the challenge of functional connectomics. *Neuron*, 74(6), pp.970–4.
- de Almeida, S.F. et al., 2007. Chemical Chaperones Reduce Endoplasmic Reticulum Stress and Prevent Mutant HFE Aggregate Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), pp.27905–27912.
- Amunts, K. et al., 2019. The Human Brain Project—Synergy between neuroscience, computing, informatics, and brain-inspired technologies. *PLOS Biology*, 17(7), p.e3000344.
- Anelli, T. et al., 2012. Fluxes at the Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Interface (MAM). *Antioxidants & redox signaling*, 16(10), pp.1077–1087.
- Ankarcrona, M. et al., 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15(4), pp.961–73.
- Aon, M.A., Cortassa, S. & O'Rourke, B., 2010. Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6-7), pp.865–877.
- Area-Gomez, E. et al., 2012. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *The EMBO journal*, 31(21), pp.4106–23.
- Arimura, N. et al., 2004. Role of CRMP-2 in neuronal polarity. *Journal of Neurobiology*, 58(1), pp.34–47.
- Arimura, N. & Kaibuchi, K., 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(3), pp.194–205.
- Armada-Moreira, A. et al., 2020. Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, p.90.
- Arnout, D. et al., 2011. Mitochondria in innate immunity. *EMBO reports*, 12(9), pp.901–910. Arruda, A.P. et al., 2014. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic

- reticulum–mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nature Medicine*, 20(12), pp.1427–1435.
- Augusto, L. et al., 2020. Toxoplasma gondii co-opts the unfolded protein response to enhance migration and dissemination of infected host cells. *mBio*, 11(4), pp.1–13.
- Avalle, L. et al., 2019. STAT3 localizes to the ER, acting as a gatekeeper for ER-mitochondrion Ca²⁺ fluxes and apoptotic responses. *Cell Death and Differentiation*, 26(5), pp.932–942.
- Bach, D. et al., 2005. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle: Effects of Type 2 Diabetes, Obesity, Weight Loss, and the Regulatory Role of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6. *Diabetes*, 54(9), pp.2685–2693.
- Bach, D. et al., 2003. Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and Mitochondrial Metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 278(19), pp.17190–17197.
- Baloh, R.H. et al., 2007. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(2), pp.422–30.
- Balsa, E. et al., 2019. ER and Nutrient Stress Promote Assembly of Respiratory Chain Supercomplexes through the PERK-eIF2 α Axis. *Molecular Cell*, 74(5), pp.877–890.e6.
- Basso, V. et al., 2018. Regulation of ER-mitochondria contacts by Parkin via Mfn2. *Pharmacological Research*, 138, pp.43–56.
- Bauer, N.C., Doetsch, P.W. & Corbett, A.H., 2015. Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic*, 16(10), pp.1039–1061.
- Baughman, J.M. et al., 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), pp.341–5.
- Baumann, O. & Walz, B., 2001. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *International review of cytology*, 205, pp.149–214.
- Bélanger, M., Allaman, I. & Magistretti, P.J., 2011. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, 14(6), pp.724–738.
- Bereiter-Hahn, J., 2014. Mitochondrial dynamics in aging and disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier B.V., pp. 93–131.
- Berliocchi, L., Bano, D. & Nicotera, P., 2005. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1464), pp.2255–8.
- Bernard-Marissal, N. et al., 2019. Altered interplay between endoplasmic reticulum

- and mitochondria in Charcot-Marie-Tooth type 2A neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(6), pp.2328–2337.
- Bernard-Marissal, N. et al., 2015. Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration. *Brain*, 138(4), pp.875–890.
- Betz, C. et al., 2013. mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31), pp.12526–34.
- Bezprozvanny, I. & Ehrlich, B.E., 1993. ATP modulates the function of inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels at two sites. *Neuron*, 10(6), pp.1175–1184.
- Bhat, T.A. et al., 2017. Endoplasmic reticulum-mediated unfolded protein response and mitochondrial apoptosis in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1867(1), pp.58–66.
- Bird, A.D. & Cuntz, H., 2019. Dissecting Sholl Analysis into Its Functional Components. *Cell Reports*, 27(10), pp.3081–3096.e5.
- Blackstone, C. & Prinz, W.A., 2016. Keeping in shape. *eLife*, 5.
- Bohovych, I. & Khalimonchuk, O., 2016. Sending Out an SOS: Mitochondria as a Signaling Hub. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, p.109.
- Boitier, E., Rea, R. & Duchen, M.R., 1999. Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca²⁺ waves in rat cortical astrocytes. *Journal of Cell Biology*, 145(4), pp.795–808.
- Bolte, S. & Cordelières, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3), pp.213–232.
- Bonneau, B. et al., 2016. IRBIT controls apoptosis by interacting with the Bcl-2 homolog, Bcl2l10, and by promoting ER-mitochondria contact. *eLife*, 5, p.e19896.
- Borgese, N. et al., 2001. Targeting of a tail-anchored protein to endoplasmic reticulum and outer membrane by independent but competing pathways. *Molecular Biology of the Cell*, 12(8), pp.2482–2496.
- Bose, M. et al., 2010. Effect of the environment on the dendritic morphology of the rat auditory cortex. *Synapse (New York, N.Y.)*, 64(2), pp.97–110.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F., 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348(6297), pp.125–132.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F., 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305), pp.117–127.
- Boutant, M. et al., 2017. Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic

- function. *The EMBO Journal*, 36(11), pp.1543–1558.
- Braakman, I. & Hebert, D.N., 2013. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), p.a013201.
- Bradke, F. & Dotti, C.G., 2000. Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Current opinion in neurobiology*, 10(5), pp.574–81.
- Brandt, T. et al., 2016. A mitofusin-dependent docking ring complex triggers mitochondrial fusion in vitro. *eLife*, 5.
- Bravo, R. et al., 2012. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(1), pp.16–20.
- Bravo, R. et al., 2011. Increased ER–mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *Journal of Cell Science J. Cell Sci*, 124(124), pp.2143–2152.
- Breckenridge, D.G. et al., 2003. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *Journal of Cell Biology*, 160(7), pp.1115–1127.
- Brini, M. et al., 2014. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(15), pp.2787–2814.
- de Brito, O.M. & Scorrano, L., 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(December), pp.605–610.
- Broughton, B.R.S., Reutens, D.C. & Sobey, C.G., 2009. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40(5).
- Bueno, A. et al., 2016. Exploring the interactions of the RAS family in the human protein network and their potential implications in RAS-directed therapies. *Oncotarget*, 7(46), pp.75810–75826.
- Byers, J.T. et al., 2009. Hydrophobic profiles of the tail anchors in SLMAP dictate subcellular targeting. *BMC Cell Biology*, 10.
- Byvaltsev, V. et al., 2010. Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases. *World Neurosurgery*, 74(1), pp.10–12.
- Caldeira, M. V. et al., 2014. Role of the ubiquitin-proteasome system in brain ischemia: Friend or foe? *Progress in Neurobiology*, 112, pp.50–69.
- Calì, T. et al., 2013. Enhanced parkin levels favor ER-mitochondria crosstalk and guarantee Ca²⁺ transfer to sustain cell bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(4), pp.495–508.
- Calkins, M.J. et al., 2011. Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal

- transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 20(23), pp.4515–4529.
- Cao, Y.-L. et al., 2017. MFN1 structures reveal nucleotide-triggered dimerization critical for mitochondrial fusion. *Nature*, 542(7641), pp.372–376.
- Cárdenas, C. et al., 2010. Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP3 Receptor Ca²⁺ Transfer to Mitochondria. *Cell*, 142(2), pp.270–283.
- Cárdenas, C. et al., 2016. Selective Vulnerability of Cancer Cells by Inhibition of Ca²⁺ Transfer from Endoplasmic Reticulum to Article. *Cell Reports*, 14, pp.2313–2324.
- Carreras-Sureda, A. et al., 2019. Non-canonical function of IRE1 α determines mitochondria-associated endoplasmic reticulum composition to control calcium transfer and bioenergetics. *Nature Cell Biology*, 21(6), pp.755–767.
- Carreras-Sureda, A., Pihán, P. & Hetz, C., 2017a. Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium*, pp.1–8.
- Carreras-Sureda, A., Pihán, P. & Hetz, C., 2017b. The Unfolded Protein Response: At the Intersection between Endoplasmic Reticulum Function and Mitochondrial Bioenergetics. *Frontiers in Oncology*, 7(April), pp.1–7.
- Carter, S.D. et al., 2020. Ribosome-associated vesicles: A dynamic subcompartment of the endoplasmic reticulum in secretory cells. *Science Advances*, 6(14), p.17.
- Cartoni, R. & Martinou, J.-C., 2009. Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot–Marie–Tooth disease type 2A. *Experimental Neurology*, 218(2), pp.268–273.
- Celsi, F. et al., 2009. Mitochondria, calcium and cell death: A deadly triad in neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(5), pp.335–344.
- Chakrabarti, R. et al., 2017. INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. *The Journal of cell biology*, p.jcb.201709111.
- Chan, D.C., 2006. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell*, 125(7), pp.1241–1252.
- CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R., 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *The Journal of biological chemistry*, 217(1), pp.383–93.
- Chandhok, G., Lazarou, M. & Neumann, B., 2018. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. *Biol. Rev*, 93, pp.933–949.
- Chandra, D. et al., 2004. Association of Active Caspase 8 with the Mitochondrial Membrane during Apoptosis: Potential Roles in Cleaving BAP31 and Caspase 3 and Mediating Mitochondrion-Endoplasmic Reticulum Cross Talk in Etoposide-

- Induced Cell Death. *Molecular and Cellular Biology*, 24(15), pp.6592–6607.
- Chen, H. et al., 2007. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, 130(3), pp.548–62.
- Chen, H. et al., 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology*, 160(2), pp.189–200.
- Chen, H. & Chan, D.C., 2006. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(4), pp.453–459.
- Chen, H., Chomyn, A. & Chan, D.C., 2005. Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), pp.26185–26192.
- Chen, K. et al., 2014. Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation. *The FASEB Journal*, 28(1), pp.382–394.
- Chen, K.-H. et al., 2004. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nature Cell Biology*, 6(9), pp.872–883.
- Chen, Y. et al., 2012. Mitofusin 2-containing Mitochondrial-Reticular Microdomains Direct Rapid Cardiomyocyte Bioenergetic Responses via Inter-Organellar Ca²⁺ Crosstalk. *Circulation research*, 111(7), p.863.
- Chen, Y. et al., 2016. The Protective Effect of Icaritin on Mitochondrial Transport and Distribution in Primary Hippocampal Neurons from 3× Tg-AD Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2).
- Chen, Y. & Dorn, G.W., 2013. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*, 340(6131), pp.471–475.
- Chen, Y., Liu, Y. & Dorn, G.W., 2011. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. *Circulation Research*, 109(12), pp.1327–1331.
- Cheng, A. et al., 2012. Involvement of PGC-1 α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nature Communications*, 3(1), p.1250.
- Cheng, X. et al., 2014. Cell-cycle arrest at G2/M and proliferation inhibition by adenovirus-expressed mitofusin-2 gene in human colorectal cancer cell lines. *Neoplasia*, 60(06), pp.620–626.
- Chio, U.S., Cho, H. & Shan, S.O., 2017. Mechanisms of tail-anchored membrane protein targeting and insertion. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33, pp.417–438.
- Choi, Y.J. et al., 2012. Inhibitory effect of mTOR activator MHY1485 on autophagy: Suppression of lysosomal fusion. *PLoS ONE*, 7(8).
- Chung, J. et al., 2015. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER - Plasma membrane contacts. *Science*, 349(6246), pp.428–432.

- Cieri, D. et al., 2018. SPLICS: a split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition. *Cell death and differentiation*, 25(6), pp.1131–1145.
- Cipolat, S. et al., 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), pp.15927–15932.
- Cline, H.T., 2001. Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(1), pp.118–126.
- Cohen, M.M. & Taresté, D., 2018. Recent insights into the structure and function of Mitofusins in mitochondrial fusion. *F1000Research*, 7.
- Connolly, N.M.C. et al., 2014. Single-cell imaging of bioenergetic responses to neuronal excitotoxicity and oxygen and glucose deprivation. *Journal of Neuroscience*, 34(31), pp.10192–10205.
- Connolly, N.M.C. & Prehn, J.H.M., 2015. The metabolic response to excitotoxicity – lessons from single-cell imaging. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(1-2), pp.75–88.
- Cosson, P. et al., 2012. Mitofusin-2 Independent Juxtaposition of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria: An Ultrastructural Study F. G. van der Goot, ed. *PLoS ONE*, 7(9), p.e46293.
- Costello, J.L. et al., 2017. Predicting the targeting of tail-anchored proteins to subcellular compartments in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 130(9), pp.1675–1687.
- Criollo, A. et al., 2007. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death and Differentiation*, 14(5), pp.1029–1039.
- Crunkhorn, S., 2018. Neurodegenerative disorders: Rescuing mitochondrial motility. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(6), p.391.
- Csordás, G. et al., 2010. Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Molecular Cell*, 39(1), pp.121–132.
- Csordás, G. et al., 2006. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 174(7), pp.915–921.
- Csordas, G., Thomas, A.P. & Hajnóczky, G., 1999. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *The EMBO Journal*, 18(1), pp.96–108.
- Cui-Wang, T. et al., 2012. Local Zones of Endoplasmic Reticulum Complexity Confine Cargo in Neuronal Dendrites. *Cell*, 148(1-2), pp.309–321.
- D’Orsi, B. et al., 2015. Bax regulates neuronal Ca²⁺Homeostasis. *Journal of Neuroscience*, 35(4), pp.1706–1722.

- D'Orsi, B. et al., 2012. Calpains are downstream effectors of bax-dependent excitotoxic apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(5), pp.1847–58.
- Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), pp.205–19.
- Daste, F. et al., 2018. The heptad repeat domain 1 of Mitofusin has membrane destabilization function in mitochondrial fusion. *EMBO reports*, 19(6).
- Dedkova, E.N. & Blatter, L.A., 2012. Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(1), pp.48–61.
- Denton, R.M., McCormack, J.G. & Edgell, N.J., 1980. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Effects of Na⁺, Mg²⁺ and ruthenium red on the Ca²⁺-stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria. *Biochemical Journal*, 190(1), pp.107–117.
- Detmer, S.A. & Chan, D.C., 2007. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *Journal of Cell Biology*, 176(4), pp.405–414.
- Dickstein, D.L. et al., 2013. Dendritic spine changes associated with normal aging. In *Dendritic Spine Plasticity in Brain Disorders*. p. Volume 251, Pages 21–32.
- Distelmaier, F. et al., 2008. Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain*, 132(4), pp.833–842.
- Dobbing, J. & Sands, J., 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*, 3(1), pp.79–83.
- Dorn, G.W., 2020. Mitofusin 2 Dysfunction and Disease in Mice and Men. *Frontiers in Physiology*, 11.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A. & Banker, G.A., 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(4), pp.1454–68.
- Du, M. et al., 2021. Mitofusin 2 but not mitofusin 1 mediates Bcl-XL-induced mitochondrial aggregation. *Journal of Cell Science*, 133(20).
- Duchen, M.R., 2000. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of physiology*, 529 Pt 1(April), pp.57–68.
- Dukanovic, J. & Rapaport, D., 2011. Multiple pathways in the integration of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(3), pp.971–980.
- Egan, B. et al., 1999. Targeting of tail-anchored proteins to yeast mitochondria in vivo. *FEBS Letters*, 451(3), pp.243–248.

- Eura, Y., 2003. Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion. *Journal of Biochemistry*, 134(3), pp.333–344.
- Fairman, W.A. & Amara, S.G., 1999. Functional diversity of excitatory amino acid transporters: Ion channel and transport modes. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 277(4 46-4).
- Fang, D. et al., 2016. Mfn2 is Required for Mitochondrial Development and Synapse Formation in Human Induced Pluripotent Stem Cells/hiPSC Derived Cortical Neurons. *Scientific Reports*, 6(1), p.31462.
- Ferrer, I., 1999. Neurons and their dendrites in frontotemporal dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 10(SUPPL. 1), pp.55–60.
- Filadi, R. et al., 2015. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum–mitochondria coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), pp.E2174–E2181.
- Filadi, R. et al., 2016. Presenilin 2 Modulates Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Coupling by Tuning the Antagonistic Effect of Mitofusin 2. *Cell Reports*, 15(10), pp.2226–2238.
- Filadi, R., Pendin, D. & Pizzo, P., 2018. Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death & Disease*, 9(3), p.330.
- Filadi, R. & Pozzan, T., 2015. Generation and functions of second messengers microdomains. *Cell Calcium*, 58(4), pp.405–414.
- Von Filseck, J.M. et al., 2015. Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science*, 349(6246), pp.432–436.
- Finch, E.A. & Augustine, G.J., 1998. Local calcium signalling by inositol-1,4,5-trisphosphate in Purkinje cell dendrites. *Nature*, 396(6713), pp.753–756.
- Flavell, S.W. et al., 2008. Genome-Wide Analysis of MEF2 Transcriptional Program Reveals Synaptic Target Genes and Neuronal Activity-Dependent Polyadenylation Site Selection. *Neuron*, 60(6), pp.1022–1038.
- Franco, A. et al., 2016. Correcting mitochondrial fusion by manipulating mitofusin conformations. *Nature*, 540(7631), pp.74–79.
- Franzini-Armstrong, C., 1999. The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13 Suppl 2, pp.S266–70.
- Friedman, J.R. et al., 2010. ER sliding dynamics and ER–mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *The Journal of Cell Biology*, 190(3), pp.363–375.
- Friedman, J.R. et al., 2011. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science*, 334(6054), pp.358–362.

- Friedman, J.R. & Voeltz, G.K., 2011. The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends in cell biology*, 21(12), pp.709–17.
- Gafni, J. et al., 1997. Xestospongins: Potent Membrane Permeable Blockers of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *Neuron*, 19, pp.723–733.
- Galmes, R. et al., 2016. ORP5/ORP8 localize to endoplasmic reticulum–mitochondria contacts and are involved in mitochondrial function. *EMBO reports*, 17(6), pp.800–810.
- Gandre-Babbe, S. & Van Der Blik, A.M., 2008. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 19(6), pp.2402–2412.
- Gautier, C.A. et al., 2016. The endoplasmic reticulum-mitochondria interface is perturbed in PARK2 knockout mice and patients with PARK2 mutations. *Human Molecular Genetics*, 25(14), p.ddw148.
- Giacomello, M. et al., 2010. Ca²⁺ Hot Spots on the Mitochondrial Surface Are Generated by Ca²⁺ Mobilization from Stores, but Not by Activation of Store-Operated Ca²⁺ Channels. *Molecular Cell*, 38(2), pp.280–290.
- Giacomello, M. & Pellegrini, L., 2016. The coming of age of the mitochondria–ER contact: a matter of thickness. *Cell Death and Differentiation*, 23(10), pp.1417–1427.
- Glancy, B. et al., 2013. Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry*, 52(16), pp.2793–809.
- Glancy, B. & Balaban, R.S., 2012. Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*, 51(14), pp.2959–73.
- Golstein, P. & Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), pp.37–43.
- Gomez-Suaga, P. et al., 2017. The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy. *Current Biology*, 27(3), pp.371–385.
- Gong, G. et al., 2015. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice. *Science*, 350(6265).
- Govek, E.-E., Newey, S.E. & Van Aelst, L., 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & development*, 19(1), pp.1–49.
- Gregory, R.B., Rychkov, G. & Barritt, G.J., 2001. Evidence that 2-aminoethyl diphenylborate is a novel inhibitor of store-operated Ca²⁺ channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors. *Biochemical Journal*, 354(2), pp.285–290.
- Grillner, S. et al., 2016. Worldwide initiatives to advance brain research. *Nature Neuroscience*, 19(9), pp.1118–1122.

- Griparic, L. et al., 2004. Loss of the Intermembrane Space Protein Mgm1/OPA1 Induces Swelling and Localized Constrictions along the Lengths of Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), pp.18792–18798.
- Guidarelli, A. et al., 2019. Calcium signals between the ryanodine receptor- and mitochondria critically regulate the effects of arsenite on mitochondrial superoxide formation and on the ensuing survival vs apoptotic signaling. *Redox Biology*, 20, pp.285–295.
- Guillet, V. et al., 2011. Bioenergetic defect associated with mK ATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation. *The FASEB Journal*, 25(5), pp.1618–1627.
- Guillet, V. et al., 2010. Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in MFN2-related Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Neurogenetics*, 11(1), pp.127–133.
- Guo, H. et al., 2017. A NMDA-receptor calcium influx assay sensitive to stimulation by glutamate and glycine/D-serine. *Scientific Reports*, 7(1), pp.1–13.
- Gurel, P.S., Hatch, A.L. & Higgs, H.N., 2014. Connecting the Cytoskeleton to the Endoplasmic Reticulum and Golgi. *Current Biology*, 24(14), pp.R660–R672.
- Hailey, D.W. et al., 2010. Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell*, 141(4), pp.656–667.
- Hales, K.G. & Fuller, M.T., 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, 90(1), pp.121–9.
- Hamasaki, M. et al., 2013. Autophagosomes form at ER–mitochondria contact sites. *Nature*, 495(7441), pp.389–393.
- Han, J. et al., 2013. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature Cell Biology*, 15(5), pp.481–490.
- Han, S. et al., 2020. Mfn2 Ablation in the Adult Mouse Hippocampus and Cortex Causes Neuronal Death. *Cells*, 9(1).
- Hansen, K.B. et al., 2017. NMDA receptors in the central nervous system. In *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 1–80.
- Hansford, R.G. & Zorov, D., 1998. Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 184(1/2), pp.359–369.
- Hardingham, G.E., Arnold, F.J.L. & Bading, H., 2001. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nature Neuroscience*, 4(3), pp.261–267.
- Harris, J.J., Jolivet, R. & Attwell, D., 2012. Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron*, 75(5), pp.762–777.

- He, W. et al., 2004. Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid- β peptide generation. *Nature Medicine*, 10(9), pp.959–965.
- Hegde, R.S. & Keenan, R.J., 2011. Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(12), pp.787–798.
- Herms, J. & Dorostkar, M.M., 2016. Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11, pp.221–250.
- Herrera-Cruz, M.S. & Simmen, T., 2017. Of yeast, mice and men: MAMs come in two flavors. *Biology Direct*, 12(1), pp.1–21.
- Herrmann, J.M. & Riemer, J., 2010. The Intermembrane Space of Mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(9), pp.1341–1358.
- Hetzer, M.W., Walther, T.C. & Mattaj, I.W., 2005. Pushing the envelope: Structure, Function, and Dynamics of the Nuclear Periphery. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), pp.347–380.
- Hewitt, V.L. et al., 2020. Decreasing pdzd8-mediated mitochondrial-ER contacts in neurons improves fitness by increasing mitophagy. *bioRxiv*, p.2020.11.14.382861.
- Higgins, D. et al., 1997. Mechanisms of neuronal polarity. *Current opinion in neurobiology*, 7(5), pp.599–604.
- Hirabayashi, Y. et al., 2017. ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca²⁺ dynamics in mammalian neurons. *Science*, 358(6363), pp.623–630.
- Hirota, J., Furuichi, T. & Mikoshiba, K., 1999. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type I is a substrate for caspase-3 and is cleaved during apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), pp.34433–34437.
- Holbro, N., Grunditz, A. & Oertner, T.G., 2009. Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35), pp.15055–15060.
- Hoppins, S. et al., 2011. The Soluble Form of Bax Regulates Mitochondrial Fusion via MFN2 Homotypic Complexes. *Molecular Cell*, 41(2), pp.150–160. Available at: [/pmc/articles/PMC3072068/](#) [Accessed May 7, 2021].
- Horie, C. et al., 2002. Characterization of signal that directs C-tail-anchored proteins to mammalian mitochondrial outer membrane. *Molecular Biology of the Cell*, 13(5), pp.1615–1625.
- Horner, S.M. et al., 2011. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35), pp.14590–14595.
- Hu, Y. et al., 2020. The AMPK-MFN2 axis regulates MAM dynamics and autophagy induced by energy stresses. *Autophagy*.

- Huang, C., Zhang, Z. & Qiu, F., 2005. Effects of 2-APB on store-operated Ca²⁺ channel currents of hepatocytes after hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban*, 25(1), pp.39–41.
- Huang, E.J. & Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), pp.677–736.
- Huang, P., Galloway, C.A. & Yoon, Y., 2011. Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *PLoS one*, 6(5), p.e20655.
- Hübner, C.A. & Kurth, I., 2014. Membrane-shaping disorders: a common pathway in axon degeneration. *Brain*, 137(12), pp.3109–3121.
- Hunter, D.R. & Haworth, R.A., 1979. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 195(2), pp.453–459.
- Hwa, J.J. et al., 2002. Differential expression of the Drosophila mitofusin genes fuzzy onions (fzo) and dmf1. *Mechanisms of Development*, 116(1-2), pp.213–216.
- Iacocca, N. et al., 2017. Protein localization at mitochondria-ER contact sites in basal and stress conditions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(DEC), p.107.
- Innocenti, G.M. & Price, D.J., 2005. Exuberance in the development of cortical networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(12), pp.955–965.
- Irwin, W.A. et al., 2003. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nature Genetics*, 35(4), pp.367–371.
- Ishihara, N. et al., 2009. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nature Cell Biology*, 11(8), pp.958–966.
- Ishihara, N., Eura, Y. & Mihara, K., 2004. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *Journal of Cell Science*, 117(26).
- Iwasawa, R. et al., 2011. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *The EMBO Journal*, 30(3), pp.556–568.
- Jackson, C.L., Walch, L. & Verbavatz, J.-M., 2016. Lipids and Their Trafficking: An Integral Part of Cellular Organization. *Developmental Cell*, 39(2), pp.139–153.
- Jacquemyn, J., Cascalho, A. & Goodchild, R.E., 2017. The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis. *EMBO reports*, 18(11), pp.1905–1921.
- Jahani-Asl, A. et al., 2007. Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), pp.23788–23798.

- Jäkel, S. & Dimou, L., 2017. Glial cells and their function in the adult brain: A journey through the history of their ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, p.24.
- Jiang, H., 2021. Quality control pathways of tail-anchored proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1868(2), p.118922.
- Jiang, Q.-X. et al., 2002. Three-dimensional structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at 24 Å resolution. *The EMBO Journal*, 21(14), pp.3575–3581.
- Johnston, B.P. & McCormick, C., 2019. Herpesviruses and the unfolded protein response. *Viruses*, 12(1), p.17.
- Jorgenson, L.A. et al., 2015. The BRAIN initiative: Developing technology to catalyze neuroscience discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1668).
- Jung, J.U. et al., 2016. NIK/MAP3K14 Regulates Mitochondrial Dynamics and Trafficking to Promote Cell Invasion. *Current Biology*, 26(24), pp.3288–3302.
- Kanemaru, K. et al., 2020. Red fluorescent CEPIA indicators for visualization of Ca²⁺ dynamics in mitochondria. *Scientific Reports*, 10(1), pp.1–9.
- Karavaeva, I.E. et al., 2015. Does mitochondrial fusion require transmembrane potential? *Biochemistry (Moscow)*, 80(5), pp.549–558.
- Karbowski, M. et al., 2002. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 159(6), pp.931–938.
- Kaufman, R.J. & Malhotra, J.D., 2014. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(10), pp.2233–2239.
- Kawada, K. et al., 2018. Involvement of endoplasmic reticulum stress and neurite outgrowth in the model mice of autism spectrum disorder. *Neurochemistry International*, 119, pp.115–119.
- Kawalec, M. et al., 2015. Mitofusin 2 Deficiency Affects Energy Metabolism and Mitochondrial Biogenesis in MEF Cells F. Cappello, ed. *PLOS ONE*, 10(7), p.e0134162.
- Kawasaki, N. et al., 2012. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Scientific reports*, 2, p.799.
- Khacho, M. & Slack, R.S., 2018. Mitochondrial dynamics in the regulation of neurogenesis: From development to the adult brain. *Developmental Dynamics*, 247(1), pp.47–53.
- Khodosevich, K. & Monyer, H., 2010. Signaling involved in neurite outgrowth of postnatally born subventricular zone neurons in vitro. *BMC Neuroscience*, 11(1), p.18.

- Khraiweh, H. et al., 2014. Mitochondrial ultrastructure and markers of dynamics in hepatocytes from aged, calorie restricted mice fed with different dietary fats. *Experimental Gerontology*, 56, pp.77–88.
- Koch, A. et al., 2005. A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), pp.5077–5086.
- Kong, H. et al., 2008. Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *Biochemical Journal*, 414(3), pp.441–452.
- Koopman, W.J.H. et al., 2006. Simultaneous quantitative measurement and automated analysis of mitochondrial morphology, mass, potential, and motility in living human skin fibroblasts. *Cytometry Part A*, 69(1), pp.1–12.
- Kornmann, B. et al., 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*, 325(5939), pp.477–81.
- Koshiba, T. et al., 2004. Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes. *Science*, 305(5685).
- Kovalski, J.R. et al., 2019. The Functional Proximal Proteome of Oncogenic Ras Includes mTORC2. *Molecular Cell*, 73(4), pp.830–844.e12.
- Kraus, F. & Ryan, M.T., 2017. The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *Journal of Cell Science*, 130(18), pp.2953–2960.
- Krols, M. et al., 2016. Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. *Acta neuropathologica*, 131(4), pp.505–23.
- Księżakowska-Łakoma, K., Żyła, M. & R. Wilczyński, J., 2014. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Menopausal Review*, 2(2), pp.136–144.
- Kühlbrandt, W., 2015. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, 13(1), p.89.
- Kumar, S. & Bandyopadhyay, U., 2005. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters*, 157(3), pp.175–188.
- Kumari, S. et al., 2012. Hyperglycemia Alters Mitochondrial Fission and Fusion Proteins in Mice Subjected to Cerebral Ischemia and Reperfusion. *Translational Stroke Research*, 3(2), pp.296–304.
- van der Laan, M., Horvath, S.E. & Pfanner, N., 2016. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Current Opinion in Cell Biology*, 41, pp.33–42.
- Lai, T.W., Zhang, S. & Wang, Y.T., 2014. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 115(C), pp.157–188.
- Lalier, L. et al., 2021. TOM20-mediated transfer of Bcl2 from ER to MAM and mitochondria upon induction of apoptosis. *Cell Death and Disease*, 12(2), pp.1–11.

- Lally, J.S. V et al., 2013. Over-expressing mitofusin-2 in healthy mature mammalian skeletal muscle does not alter mitochondrial bioenergetics. *PLoS one*, 8(1), p.e55660.
- Lankiewicz, S., 2000. Activation of Calpain I Converts Excitotoxic Neuron Death into a Caspase-independent Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), pp.17064–17071.
- Lanner, J.T. et al., 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(11), p.a003996.
- Larrea, D. et al., 2019. MFN2 mutations in Charcot–Marie–Tooth disease alter mitochondria-associated ER membrane function but do not impair bioenergetics. *Human Molecular Genetics*, 28(11), pp.1782–1800.
- Lazarou, M. et al., 2015. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 524(7565), pp.309–314.
- Leal, N.S. et al., 2016. Mitofusin-2 knockdown increases ER-mitochondria contact and decreases amyloid β -peptide production. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(9), pp.1686–1695.
- Leal, N.S. & Martins, L.M., 2021. Mind the Gap: Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines*, 9(2), p.227.
- Lee, J.E. et al., 2016. Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature*, 540(7631), pp.139–143.
- Lee, K.-S. & Lu, B., 2014. The myriad roles of Miro in the nervous system: axonal transport of mitochondria and beyond. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, p.330.
- Lee, S. et al., 2019. Increased ER-mitochondria tethering promotes axon regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(32), pp.16074–16079.
- Lee, S. et al., 2007. Mitochondrial Fission and Fusion Mediators, hFis1 and OPA1, Modulate Cellular Senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), pp.22977–22983.
- Lee, S. et al., 2012. Mitofusin 2 is necessary for striatal axonal projections of midbrain dopamine neurons. *Human Molecular Genetics*, 21(22), pp.4827–4835.
- Lees, J.G., Gardner, D.K. & Harvey, A.J., 2017. Pluripotent Stem Cell Metabolism and Mitochondria: Beyond ATP. *Stem Cells International*, 2017, pp.1–17.
- Leggio, M.G. et al., 2005. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behavioural Brain Research*, 163(1), pp.78–90.
- Légitot, A. et al., 2019. Mitochondria-associated membranes (MAMs) are involved in

- bax mitochondrial localization and cytochrome c release. *Microbial Cell*, 6(5), pp.257–266.
- Leist, M. et al., 1997. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *Journal of Experimental Medicine*, 185(8), pp.1481–1486.
- Lewerenz, J. & Maher, P., 2015. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-What is the evidence? *Frontiers in Neuroscience*, 9(DEC), p.469.
- Lewis, M.R. & Lewis, W.H., 1915. Mitochondria (and other cytoplasmic structures) in tissue cultures. *American Journal of Anatomy*, 17(3), pp.339–401.
- Lewis, S.C., Uchiyama, L.F. & Nunnari, J., 2016. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6296), p.aaf5549.
- Li, D. et al., 2019. Structural and evolutionary characteristics of dynamin-related GTPase OPA1. *PeerJ*, 2019(7).
- Li, Z. et al., 2004. The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses. *Cell*, 119(6), pp.873–887.
- Liesa, M., Palacín, M. & Zorzano, A., 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews*, 89(3), pp.799–845.
- Liesa, M. & Shirihai, O.S., 2013. Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, 17(4), pp.491–506.
- Lim, Y. et al., 2015. Hereditary spastic paraplegia-linked REEP1 modulates endoplasmic reticulum/mitochondria contacts. *Annals of Neurology*, 78(5), pp.679–696.
- Lipton, S.A., 2008. NMDA receptor activity regulates transcription of antioxidant pathways. *Nature Neuroscience*, 11(4), pp.381–382.
- Di Lisa, F. et al., 2011. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(7), pp.1316–1322.
- Liu, Y. & Zhu, X., 2017. Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases. *Translational neurodegeneration*, 6, p.21.
- Liu, Z. & Butow, R.A., 2006. Mitochondrial Retrograde Signaling. *Annual Review of Genetics*, 40(1), pp.159–185.
- Loiseau, D. et al., 2007. Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Annals of Neurology*, 61(4), pp.315–323.
- López-Doménech, G. et al., 2018. Miro proteins coordinate microtubule- and actin-dependent mitochondrial transport and distribution. *The EMBO Journal*, 37(3), pp.321–336.

- Lorenz, C. et al., 2017. Human iPSC-Derived Neural Progenitors Are an Effective Drug Discovery Model for Neurological mtDNA Disorders. *Cell Stem Cell*, 20(5), pp.659–674.e9.
- Malhotra, J.D. & Kaufman, R.J., 2007. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in cell & developmental biology*, 18(6), pp.716–31.
- Manczak, M., Calkins, M.J. & Reddy, P.H., 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. *Human Molecular Genetics*, 20(13), pp.2495–2509.
- Manor, U. et al., 2015. A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *eLife*, 4.
- Mao, L.M. & Wang, J.Q., 2016. Synaptically Localized Mitogen-Activated Protein Kinases: Local Substrates and Regulation. *Molecular Neurobiology*, 53(9), pp.6309–6315.
- Marchi, S. et al., 2018. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*, 69, pp.62–72.
- Marchi, S. & Pinton, P., 2014. The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *The Journal of physiology*, 592(5), pp.829–39.
- Markram, H. et al., 2011. Introducing the Human Brain Project. *Procedia Computer Science*, 7, pp.39–42.
- Martín, M.A. et al., 2005. Leigh Syndrome Associated With Mitochondrial Complex I Deficiency Due to a Novel Mutation in the NDUFS1 Gene. *Archives of Neurology*, 62(4), p.659.
- Martins De Brito, O. & Scorrano, L., 2009. Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: The role of Ras.
- Martorell-Riera, A. et al., 2014. Mfn 2 downregulation in excitotoxicity causes mitochondrial dysfunction and delayed neuronal death. *The EMBO Journal*, 33(20), pp.2388–2407.
- Martorell-Riera, A., 2015. *Regulación de la dinámica mitocondrial en neuronas sometidas a excitotoxicidad*, Universitat de Barcelona.
- Masaki, R., Kameyama, K. & Yamamoto, A., 2003. Post-Translational Targeting of a Tail-Anchored Green Fluorescent Protein to the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biochemistry*, 134(3), pp.415–426.
- Mateja, A. & Keenan, R.J., 2018. A structural perspective on tail-anchored protein biogenesis by the GET pathway. *Current Opinion in Structural Biology*, 51, pp.195–202.
- Mattie, S. et al., 2018. A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus

- in the mitochondrial intermembrane space. *The Journal of cell biology*, 217(2), pp.507–515.
- Mattson, M.P., 2019. Excitotoxicity. *tress: Physiology, Biochemistry, and Pathology: Handbook of Stress Series*, 3(Chapter 11), pp.126–134.
- Mattson, M.P. & Partin, J., 1999. Evidence for mitochondrial control of neuronal polarity. *Journal of Neuroscience Research*, 56(1), pp.8–20.
- Mauceri, D. et al., 2011. Nuclear Calcium-VEGFD Signaling Controls Maintenance of Dendrite Arborization Necessary for Memory Formation. *Neuron*, 71(1), pp.117–130.
- Mccarron, J.G. et al., 2013. Examining the role of mitochondria in Ca²⁺ Signaling in native vascular smooth muscle. *Microcirculation*, 20(4), pp.317–329.
- McCorquodale, D. et al., 2011. Mutation screening of spastin, atlastin, and REEP1 in hereditary spastic paraplegia. *Clinical Genetics*, 79(6), pp.523–530.
- McLelland, G.L. et al., 2018. Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy. *eLife*, 7.
- van Meer, G., Voelker, D.R. & Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), pp.112–124.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M. & Nunnari, J., 2004. Mitochondrial Fusion Intermediates Revealed in Vitro. *Science*, 305(5691), pp.1747–1752.
- Mehta, A. et al., 2013. Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*, 698(1-3), pp.6–18.
- Melser, S., Lavie, J. & Bénard, G., 2015. Mitochondrial degradation and energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(10), pp.2812–2821.
- Meyer, G., 2007. Genetic control of neuronal migrations in human cortical development. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 189, pp.1 p preceding 1, 1–111.
- Meyer-Franke, A. et al., 1998. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron*, 21(4), pp.681–93.
- Michalak, M., Robert Parker, J. & Opas, M., 2002. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 32(5-6), pp.269–278.
- Mishra, P. & Chan, D.C., 2016a. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *The Journal of Cell Biology*, 212(4), pp.379–387.
- Mishra, P. & Chan, D.C., 2016b. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Cell Biology*, 212(4), pp.379–387.
- Misko, A. et al., 2010. Mitofusin 2 Is Necessary for Transport of Axonal Mitochondria

- and Interacts with the Miro/Milton Complex. *Journal of Neuroscience*, 30(12), pp.4232–4240.
- Misko, A. et al., 2012. Mitofusin2 Mutations Disrupt Axonal Mitochondrial Positioning and Promote Axon Degeneration. *Journal of Neuroscience*, 32(12), pp.4145–4155.
- Missiroli, S. et al., 2018. Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death & Disease*, 9(3), p.329.
- Molina, A.J.A. et al., 2009. Mitochondrial Networking Protects β -Cells From Nutrient-Induced Apoptosis. *Diabetes*, 58(10), pp.2303–2315.
- Monaco, G. et al., 2012. Selective regulation of IP₃-receptor-mediated Ca²⁺ signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-Xl. *Cell Death and Differentiation*, 19(2), pp.295–309.
- Montesinos, J. & Area-Gomez, E., 2020. Isolation of mitochondria-associated ER membranes. In *Methods in cell biology*. pp. 33–44.
- Morciano, G. et al., 2018. Role of Mitochondria-Associated ER Membranes in Calcium Regulation in Cancer-Specific Settings. *Neoplasia*, 20(5), pp.510–523.
- Mourier, A. et al., 2015. Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels. *The Journal of Cell Biology*, 208(4).
- Mukherjee, S. et al., 2012. Transforming growth factor- β evokes Ca²⁺ waves and enhances gene expression in human pulmonary fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46(6), pp.757–764.
- Muller, B. et al., 2019. Application of extracellular flux analysis for determining mitochondrial function in mammalian oocytes and early embryos. *Scientific Reports*, 9(1), pp.1–14.
- Muñoz, J.P. et al., 2013. Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *The EMBO journal*, 32(17), pp.2348–61.
- Murphy, E. et al., 2016. Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease. *Circulation Research*, 118(12), pp.1960–1991.
- Myoung Kyu Park, M.K. et al., 2008. The Endoplasmic Reticulum as an Integrator of Multiple Dendritic Events. *The Neuroscientist*, 14(1), pp.68–77.
- Nakazawa, S., Mizuno, H. & Iwasato, T., 2018. Differential dynamics of cortical neuron dendritic trees revealed by long-term in vivo imaging in neonates. *Nature Communications*, 9(1), p.3106.
- Naon, D. et al., 2016. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum–mitochondria tether. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), pp.11249–11254.
- Nemani, N. et al., 2018. MIRO-1 Determines Mitochondrial Shape Transition upon GPCR Activation and Ca²⁺ Stress. *Cell Reports*, 23(4), pp.1005–1019.

- Neusch, C. et al., 2007. Mitofusin 2 gene mutation (R94Q) causing severe early-onset axonal polyneuropathy (CMT2A). *European Journal of Neurology*, 14(5), pp.575–577.
- Neuspiel, M. et al., 2005. Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *The Journal of biological chemistry*, 280(26), pp.25060–70.
- Ngoh, G. a., Papanicolaou, K.N. & Walsh, K., 2012. Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, 287(24), pp.20321–20332.
- Nguyen, H.T.N. et al., 2018. Impaired neurite development associated with mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from exfoliated deciduous tooth-derived pulp stem cells of children with autism spectrum disorder. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 16, pp.24–31.
- Ni, H.-M., Williams, J.A. & Ding, W.-X., 2015. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biology*, 4, pp.6–13.
- Nickel, A., Kohlhaas, M. & Maack, C., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, pp.26–33.
- Niedzielski, a S. & Wenthold, R.J., 1995. Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(3 Pt 2), pp.2338–2353.
- O’Rahilly, R. & Müller, F., 2006. *The embryonic human brain: an atlas of developmental stages*, Wiley-Liss.
- Okano, H., Miyawak, A. & Kasai, K., 2015. Brain/MINDS: Brain-mapping project in Japan. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1668).
- Orrenius, S., 2004. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology letters*, 149(1-3), pp.19–23.
- Osman, C., Voelker, D.R. & Langer, T., 2011. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 192(1), pp.7–16.
- Otera, H. et al., 2007. A novel insertion pathway of mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments. *Journal of Cell Biology*, 179(7), pp.1355–1363.
- Paillusson, S. et al., 2016. There’s Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. *Trends in Neurosciences*, 39(3), pp.146–157.
- Pajak, B. et al., 2020. 2-Deoxy-D-Glucose and its analogs: From diagnostic to therapeutic agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1).

- Palty, R. et al., 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), pp.436–441.
- Park, S.J. et al., 2017. DISC1 Modulates Neuronal Stress Responses by Gate-Keeping ER-Mitochondria Ca²⁺ Transfer through the MAM. *Cell Reports*, 21(10), pp.2748–2759.
- Park, Y.-Y. & Cho, H., 2012. Mitofusin 1 is degraded at G2/M phase through ubiquitylation by MARCH5. *Cell division*, 7(1), p.25.
- Parys, J.B. & Vervliet, T., 2020. New Insights in the IP3 Receptor and Its Regulation. In Springer, Cham, pp. 243–270.
- Peng, C. et al., 2015. Mitofusin 2 ameliorates hypoxia-induced apoptosis via mitochondrial function and signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 69, pp.29–40.
- Pernas, L. & Scorrano, L., 2015. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function.
- Pham, A.H. et al., 2012. Loss of Mfn2 results in progressive, retrograde degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal circuit. *Human Molecular Genetics*, 21(22), pp.4817–4826.
- Pich, S. et al., 2005. The Charcot – Marie – Tooth type 2A gene product , Mfn2 , up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. , 14(11), pp.1405–1415.
- Pickles, S., Vigié, P. & Youle, R.J., 2018. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current Biology*, 28(4), pp.R170–R185.
- Piedras-Renteria, E.S. et al., 2012. *Calcium Signaling*, Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-2888-2>.
- Pihán, P., Carreras-Sureda, A. & Hetz, C., 2017. BCL-2 family: Integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death and Differentiation*, 24(9), pp.1478–1487.
- Pistor, S. et al., 1994. The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *EMBO Journal*, 13(4), pp.758–763.
- Plotegher, N. et al., 2020. Impaired cellular bioenergetics caused by GBA1 depletion sensitizes neurons to calcium overload. *Cell Death and Differentiation*, 27(5), pp.1588–1603.
- Poo, M. ming et al., 2016. China Brain Project: Basic Neuroscience, Brain Diseases, and Brain-Inspired Computing. *Neuron*, 92(3), pp.591–596.
- Poulos, T.L., 2014. Heme enzyme structure and function. *Chemical Reviews*, 114(7), pp.3919–3962.

- Prasai, K., 2017. Regulation of mitochondrial structure and function by protein import: A current review. *Pathophysiology*, 24(3), pp.107–122.
- Prause, J. et al., 2013. Altered localization, abnormal modification and loss of function of Sigma receptor-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 22(8), pp.1581–1600.
- Prudent, J. et al., 2015. MAPL SUMOylation of Drp1 Stabilizes an ER/Mitochondrial Platform Required for Cell Death. *Molecular cell*, 59(6), pp.941–55.
- Purves, D. et al., 2001. The Molecular Basis of Neural Induction.
- Qi, Y. et al., 2016. Structures of human mitofusin 1 provide insight into mitochondrial tethering. *The Journal of cell biology*, 215(5), pp.621–629.
- Qin, Z.H. et al., 1998. Nuclear factor- κ B contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Molecular Pharmacology*, 53(1), pp.33–42.
- Qiu, J. et al., 2013. Mitochondrial calcium uniporter Mcu controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals. *Nature Communications*, 4, p.ncomms3034.
- Ramírez, O.A. & Couve, A., 2011. The endoplasmic reticulum and protein trafficking in dendrites and axons. *Trends in cell biology*, 21(4), pp.219–27.
- Rao, M. et al., 2016. Multiple selection filters ensure accurate tail-anchored membrane protein targeting. *eLife*, 5(DECEMBER2016).
- Rapaport, D. et al., 1998. *Fzo1p Is a Mitochondrial Outer Membrane Protein Essential for the Biogenesis of Functional Mitochondria in Saccharomyces cerevisiae**, *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), pp.20150–20155.
- Raturi, A. & Simmen, T., 2013. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(1), pp.213–224.
- Rehman, J. et al., 2012. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *The FASEB Journal*, 26(5), pp.2175–2186.
- Reid, D.W. & Nicchitta, C. V., 2015. Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(4), pp.221–231.
- Reiner, A. & Levitz, J., 2018. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*, 98(6), pp.1080–1098.
- Renvoisé, B. & Blackstone, C., 2010. Emerging themes of ER organization in the development and maintenance of axons. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(5), pp.531–537.
- Rintoul, G.L. & Reynolds, I.J., 2010. Mitochondrial trafficking and morphology in neuronal injury. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*,

- 1802(1), pp.143–150.
- Rizzo, F. et al., 2016. Selective mitochondrial depletion, apoptosis resistance, and increased mitophagy in human Charcot-Marie-Tooth 2A motor neurons. *Human Molecular Genetics*, 25(19), pp.4266–4281.
- Rizzuto, R. et al., 1998. Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. *Science*, 280(5370), pp.1763–1766.
- Rizzuto, R. et al., 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), pp.566–578.
- Roach, K.M. & Bradding, P., 2020. Ca²⁺ signalling in fibroblasts and the therapeutic potential of KCa3.1 channel blockers in fibrotic diseases. *British Journal of Pharmacology*, 177(5), pp.1003–1024.
- Rocha, A.G. et al., 2018. Mfn2 agonists reverse mitochondrial defects in preclinical models of Charcot Marie Tooth disease type 2A. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6386), pp.336–341.
- Rochin, L. et al., 2019. Orp5 transfers phosphatidylserine to mitochondria and regulates mitochondrial calcium uptake at endoplasmic reticulum - Mitochondria contact sites. *bioRxiv*, p.695577.
- Roderick, H.L., Berridge, M.J. & Bootman, M.D., 2003. Calcium-induced calcium release. *Current Biology*, 13(11), p.R425.
- Rojo, M. et al., 2002. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins , ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *Cell Science*, 115, pp.1663–1674.
- Romero-García, S. & Prado-García, H., 2019. Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 54(4), pp.1155–1167.
- Rosencrans, W.M. et al., 2021. VDAC regulation of mitochondrial calcium flux: From channel biophysics to disease. *Cell Calcium*, 94, p.102356.
- Rossi, A. et al., 2020. Defective Mitochondrial Pyruvate Flux Affects Cell Bioenergetics in Alzheimer's Disease-Related Models. *Cell Reports*, 30(7), pp.2332–2348.e10.
- Rowland, A.A. & Voeltz, G.K., 2012. Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), pp.607–625.
- Ruas, M. et al., 2015. Expression of Ca²⁺-permeable two-pore channels rescues NAADP signalling in TPC-deficient cells. *The EMBO Journal*, 34(13), pp.1743–1758.
- Rueda, C.B. et al., 2016. Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺-regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(8), pp.1158–1166.

- Ruiz, A., Matute, C. & Alberdi, E., 2009. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and IP(3) receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell calcium*, 46(4), pp.273–81.
- Ruzankina, Y. et al., 2007. Deletion of the Developmentally Essential Gene ATR in Adult Mice Leads to Age-Related Phenotypes and Stem Cell Loss. *Cell Stem Cell*, 1(1), pp.113–126.
- Sampieri, A. et al., 2018. Association of the IP3R to STIM1 provides a reduced intraluminal calcium microenvironment, resulting in enhanced store-operated calcium entry. *Scientific Reports*, 8(1), pp.1–13.
- Samtleben, S. et al., 2013. Direct imaging of ER calcium with targeted-esterase induced dye loading (TED). *Journal of visualized experiments : JoVE*, (75), p.e50317.
- Santel, A. et al., 2003. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 116(13).
- Santel, A. & Fuller, M.T., 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of cell science*, 114(Pt 5), pp.867–74.
- Saporta, M.A. et al., 2015. Axonal Charcot-Marie-Tooth disease patient-derived motor neurons demonstrate disease-specific phenotypes including abnormal electrophysiological properties. *Experimental Neurology*, 263, pp.190–199.
- Sargent, P.B., 1989. What distinguishes axons from dendrites? Neurons know more than we do. *Trends in neurosciences*, 12(6), pp.203–5.
- Sassano, M.L., Van Vliet, A.R. & Agostinis, P., 2017. Mitochondria-Associated Membranes As Networking Platforms and Regulators of Cancer Cell Fate. *Front. Oncol*, 7, p.174.
- Satori, C.P. et al., 2013. Bioanalysis of eukaryotic organelles. *Chemical reviews*, 113(4), pp.2733–811.
- Sattler, R. & Tymianski, M., 2001. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Molecular neurobiology*, 24(1-3), pp.107–29.
- Scheffler, I.E., 2008. *Mitochondria*, Wiley-Liss.
- Schiavon, C.R., Shadel, G.S. & Manor, U., 2021. Impaired Mitochondrial Mobility in Charcot-Marie-Tooth Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, p.35.
- Schneeberger, M. et al., 2013. Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell*, 155(1), pp.172–187.
- Schon, E.A. & Area-Gomez, E., 2013. Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 55, pp.26–36.
- Schrepfer, E. & Scorrano, L., 2016. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism.

- Molecular Cell*, 61(5), pp.683–94.
- Schwarz, D.S. & Blower, M.D., 2016. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(1), pp.79–94.
- Scorrano, L. et al., 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: A control point for apoptosis. *Science*, 300(5616), pp.135–139.
- Sebastián, D. et al., 2012. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), pp.5523–8.
- Segalés, J. et al., 2013. A form of mitofusin 2 (Mfn2) lacking the transmembrane domains and the COOH-terminal end stimulates metabolism in muscle and liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2(37), pp.1208–1221.
- Segarra-Mondejar, M. et al., 2018. Synaptic activity-induced glycolysis facilitates membrane lipid provision and neurite outgrowth. *The EMBO journal*, 37(9), p.e97368.
- Seidlmayer, L.K. et al., 2019. Mitofusin 2 Is Essential for IP₃-Mediated SR/Mitochondria Metabolic Feedback in Ventricular Myocytes. *Frontiers in Physiology*, 10, p.733.
- Semple, B.D. et al., 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, 106-107, pp.1–16.
- Sena, L.A. & Chandel, N.S., 2012. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell*, 48(2), pp.158–167.
- Shibata, Y. et al., 2008. The Reticulon and Dp1/Yop1p Proteins Form Immobile Oligomers in the Tubular Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), pp.18892–18904.
- Shibata, Y., Voeltz, G.K. & Rapoport, T.A., 2006. Rough sheets and smooth tubules. *Cell*, 126(3), pp.435–9.
- Shim, S.Y. et al., 2008. Protein 600 Is a Microtubule/Endoplasmic Reticulum-Associated Protein in CNS Neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(14), pp.3604–3614.
- Shirendeb, U. et al., 2011. Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: Implications for selective neuronal damage. *Human Molecular Genetics*, 20(7), pp.1438–1455.
- Silbereis, J.C. et al., 2016. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron*, 89(2), pp.248–268.
- Silva Ramos, E., Larsson, N.-G. & Mourier, A., 2016. Bioenergetic roles of mitochondrial fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(8), pp.1277–1283.

- Da Silva, J.S. & Dotti, C.G., 2002. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9), pp.694–704.
- Simanshu, D.K., Nissley, D. V. & McCormick, F., 2017. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), pp.17–33.
- Simmen, T. et al., 2005. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *The EMBO journal*, 24(4), pp.717–29.
- Sironi, L. et al., 2020. Dysregulated Interorganellar Crosstalk of Mitochondria in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease. *Cells*, 9(1), p.233.
- Sivitz, W.I. & Yorek, M.A., 2010. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(4), pp.537–577.
- Sladeczek, F. et al., 1985. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature*, 317(6039), pp.717–719.
- Smith, J.A., 2021. STING, the Endoplasmic Reticulum, and Mitochondria: Is Three a Crowd or a Conversation? *Frontiers in Immunology*, 11, p.3556.
- Smith, R.L. et al., 2018. Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. *Endocrine Reviews*, 39(4), pp.489–517.
- Sokka, A.-L. et al., 2007. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(4), pp.901–908.
- Son, G. & Han, J., 2018. Roles of mitochondria in neuronal development. *BMB reports*, 51(11), pp.549–556.
- Sood, A. et al., 2014. A Mitofusin-2–dependent inactivating cleavage of Opa1 links changes in mitochondria *crístae* and ER contacts in the postprandial liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(45), pp.16017–16022.
- Soriano, F.X. et al., 2008. Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NR2B PDZ ligand. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(42), pp.10696–710.
- Sousa, A.M.M. et al., 2017. Evolution of the Human Nervous System Function, Structure, and Development. *Cell*, 170(2), pp.226–247.
- Spacek, J. & Harris, K.M., 1997. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(1), pp.190–203.
- De Stefani, D. et al., 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476.

- Stiles, J. & Jernigan, T.L., 2010. The basics of brain development. *Neuropsychology review*, 20(4), pp.327–48.
- Stoica, R. et al., 2016. ALS / FTD -associated FUS activates GSK -3 β to disrupt the VAPB – PTPIP 51 interaction and ER –mitochondria associations. *EMBO reports*, 17(9), pp.1326–1342.
- Stoica, R. et al., 2014. ER–mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nature Communications*, 5(1), p.3996.
- Subramanian, K. et al., 2019. Coenzyme Q biosynthetic proteins assemble in a substrate-dependent manner into domains at ER–mitochondria contacts. *Journal of Cell Biology*, 218(4), pp.1353–1369.
- Südhof, T.C., 2012. Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), p.a011353.
- Sugiura, A. et al., 2013. MITOL regulates endoplasmic reticulum–mitochondria contacts via Mitofusin2. *Molecular cell*, 51(1), pp.20–34.
- Suzuki, M. et al., 2006. Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *European Journal of Neuroscience*, 24(3), pp.645–653.
- Swenson, S.A. et al., 2020. From Synthesis to Utilization: The Ins and Outs of Mitochondrial Heme. *Cells*, 9(3), p.579.
- Szabadkai, G. et al., 2006. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *Journal of Cell Biology*, 175(6), pp.901–911.
- Szalait, G. et al., 2000. Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), pp.15305–15313.
- Tagaya, M. & Arasaki, K., 2017. Regulation of mitochondrial dynamics and autophagy by the mitochondria-associated membrane. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 33–47.
- Tambini, M.D. et al., 2016. ApoE4 upregulates the activity of mitochondria-associated ER membranes. *EMBO reports*, 17(1), pp.27–36.
- Tanaka, A. et al., 2010. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *Journal of Cell Biology*, 191(7), pp.1367–1380.
- Terasaki, M. et al., 2013. Stacked endoplasmic reticulum sheets are connected by helicoidal membrane motifs. *Cell*, 154(2), pp.285–96.
- Terasaki, M., Chen, L.B. & Fujiwara, K., 1986. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *The Journal of Cell Biology*, 103(4), pp.1557–1568.
- Thaher, O. et al., 2018. The thiol switch C684 in Mitofusin-2 mediates redox-induced

- alterations of mitochondrial shape and respiration. *Neurochemistry International*, 117, pp.167–173.
- Tian, F. & Zhang, Y., 2021. Overexpression of SERCA2a Alleviates Cardiac Microvascular Ischemic Injury by Suppressing Mfn2-Mediated ER/Mitochondrial Calcium Tethering. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
- Tilokani, L. et al., 2018. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, 62, pp.341–360.
- Treiman, M., Caspersen, C. & Christensen, S.B., 1998. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19(4), pp.131–135.
- Trigo, D., Goncalves, M.B. & Corcoran, J.P.T., 2019. The regulation of mitochondrial dynamics in neurite outgrowth by retinoic acid receptor β signaling. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(6), pp.7225–7235.
- Tripathi, P. & Sieber, F., 2020. The Adult Central Nervous System: Anatomy and Physiology. In *Essentials of Neurosurgical Anesthesia & Critical Care*. Cham: Springer International Publishing, pp. 3–13.
- Tubbs, E. et al., 2014. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Integrity Is Required for Insulin Signaling and Is Implicated in Hepatic Insulin Resistance. *Diabetes*, 63(10), pp.3279–3294.
- Tur, J. et al., 2020. Mitofusin 2 in Macrophages Links Mitochondrial ROS Production, Cytokine Release, Phagocytosis, Autophagy, and Bactericidal Activity. *Cell Reports*, 32(8), p.108079.
- Turney, S.G. & Bridgman, P.C., 2005. Laminin stimulates and guides axonal outgrowth via growth cone myosin II activity. *Nature Neuroscience*, 8(6), pp.717–719.
- Underwood, E. et al., 2020. A method for assessing tissue respiration in anatomically defined brain regions. *Scientific Reports*, 10(1), pp.1–14.
- Vaarmann, A. et al., 2016. Mitochondrial biogenesis is required for axonal growth. *Development (Cambridge, England)*, 143(11), pp.1981–92.
- Vance, J.E., 2014. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(4), pp.595–609.
- Vance, J.E., 1991. Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine are preferentially translocated between rat liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 266(1), pp.89–97.
- Vance, J.E., 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 265(13), pp.7248–56.
- Vance, J.E. & Steenbergen, R., 2005. Metabolism and functions of phosphatidylserine.

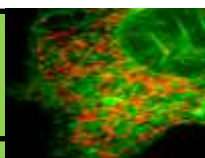
- Progress in Lipid Research*, 44(4), pp.207–234.
- Vanderheyden, V. et al., 2009. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(6), pp.959–970.
- Verhoeven, K., 2006. MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain*, 129(8), pp.2093–2102.
- Verkhatsky, a & Shmigol, a, 1996. Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell calcium*, 19(1), pp.1–14.
- Visavadiya, N.P. et al., 2016. Integrin-FAK signaling rapidly and potently promotes mitochondrial function through STAT3. *Cell Communication and Signaling*, 14(1), pp.1–15.
- Vitali, D.G. et al., 2018. The GET pathway can increase the risk of mitochondrial outer membrane proteins to be mistargeted to the ER. *Journal of Cell Science*, 131(10).
- van Vliet, A.R., Verfaillie, T. & Agostinis, P., 2014. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(10), pp.2253–2262.
- Voeltz, G.K., Rolls, M.M. & Rapoport, T.A., 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO reports*, 3(10), pp.944–950.
- Wai, T. et al., 2016. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(2), pp.105–117.
- Walther, D.M. & Rapoport, D., 2009. Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(1), pp.42–51.
- Wang, B. et al., 2020. Inhibition of ER stress improves progressive motor deficits in a REEP1-null mouse model of hereditary spastic paraplegia. *Biology Open*, 9(9).
- Wang, N. et al., 2021. The MAMs Structure and Its Role in Cell Death. *Cells*, 10(3).
- Wang, P. et al., 2015. Distinct mechanisms controlling rough and smooth endoplasmic reticulum contacts with mitochondria. *Journal of Cell Science*, 128(15), pp.2759–2765.
- Wang, W. et al., 2015. MFN2 couples glutamate excitotoxicity and mitochondrial dysfunction in motor neurons. *The Journal of biological chemistry*, 290(1), pp.168–82.
- Wang, W. et al., 2012. Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of mitofusin-2 via Bax signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Medical Oncology*, 29(1), pp.70–76.
- Wang, W., Fernandez-Sanz, C. & Sheu, S.S., 2018. Regulation of mitochondrial bioenergetics by the non-canonical roles of mitochondrial dynamics proteins in

- the heart. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1864(5), pp.1991–2001.
- Wang, X. et al., 2009. Impaired Balance of Mitochondrial Fission and Fusion in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 29(28), pp.9090–9103.
- Wang, X. et al., 2009. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(28), pp.9090–103.
- Wang, X. & Schwarz, T.L., 2009. The Mechanism of Ca²⁺-Dependent Regulation of Kinesin-Mediated Mitochondrial Motility. *Cell*, 136(1), pp.163–174.
- Wang, Y. et al., 2019. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(7), p.cns.13116.
- Wang, Y. & Qin, Z.H., 2010. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*, 15(11), pp.1382–1402.
- Wappler, E.A. et al., 2013. Mitochondrial Dynamics Associated with Oxygen-Glucose Deprivation in Rat Primary Neuronal Cultures S. Strack, ed. *PLoS ONE*, 8(5), p.e63206.
- Watanabe, K. et al., 2016. Endoplasmic Reticulum-Localized Transmembrane Protein Dpy19L1 Is Required for Neurite Outgrowth. *PloS one*, 11(12), p.e0167985.
- Watanabe, S. et al., 2016. Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS. *EMBO molecular medicine*, 8(12), pp.1421–1437.
- Werner, E. & Werb, Z., 2002. Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *Journal of Cell Biology*, 158(2), pp.357–368.
- Westermann, B., 2012. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(10), pp.1833–1838.
- Westermann, B., 2010. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(12), pp.872–884.
- Westphal, D., Kluck, R.M. & Dewson, G., 2014. Building blocks of the apoptotic pore: How Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 21(2), pp.196–205.
- Westrate, L.M. et al., 2015. Form Follows Function: The Importance of Endoplasmic Reticulum Shape. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), pp.791–811.
- White, R.J. & Reynolds, I.J., 1995. Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 15(2), pp.1318–1328.

- Wiemerslage, L. & Lee, D., 2016. Quantification of mitochondrial morphology in neurites of dopaminergic neurons using multiple parameters. *Journal of Neuroscience Methods*, 262, pp.56–65.
- Wiley, S.E. et al., 2013. Wolfram Syndrome protein, Miner1, regulates sulphhydryl redox status, the unfolded protein response, and Ca²⁺ homeostasis. *EMBO Molecular Medicine*, 5(6), pp.904–918.
- Win Oo, Y. et al., 2015. Essential Role of Calmodulin in RyR Inhibition by Dantrolene. *MOLECULAR PHARMACOLOGY Mol Pharmacol*, 88, pp.57–63.
- Wong, R.O.L. & Ghosh, A., 2002. Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(10), pp.803–812.
- Wu, J. et al., 2014. Red fluorescent genetically encoded Ca²⁺ indicators for use in mitochondria and endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal*, 464(1), pp.13–22.
- Xing, X. et al., 2014. PP242 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of gastric cancer through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Anti-Cancer Drugs*, 25(10), pp.1129–1140.
- Xu, L. et al., 2020. MFN2 contributes to metabolic disorders and inflammation in the aging of rat chondrocytes and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 28(8), pp.1079–1091.
- Xu, X. et al., 2013. Mitochondrial Regulation in Pluripotent Stem Cells. *Cell Metabolism*, 18(3), pp.325–332.
- Yao, C.H. et al., 2019. Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. *eLife*, 8.
- Yeen, T.H. et al., 2004. Novel targeting signals mediate the sorting of different isoforms of the tail-anchored membrane protein cytochrome b5 to either endoplasmic reticulum or mitochondria. *Plant Cell*, 16(11), pp.3002–3019.
- Yépez, V.A. et al., 2018. OCR-Stats: Robust estimation and statistical testing of mitochondrial respiration activities using seahorse xf analyzer. *PLoS ONE*, 13(7), p.e0199938.
- Yoo, S.M. & Jung, Y.K., 2018. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. *Molecules and Cells*, 41(1), pp.18–26.
- Yoon, Y., Pitts, K.R. & McNiven, M.A., 2001. Mammalian Dynamin-like Protein DLP1 Tubulates Membranes J. Bonifacino, ed. *Molecular Biology of the Cell*, 12(9), pp.2894–2905.
- Ypsilanti, A.R. & Rubenstein, J.L.R., 2016. Transcriptional and epigenetic mechanisms of early cortical development – an examination of how Pax6 coordinates cortical development. *The Journal of comparative neurology*, 524(3), p.609.
- Yu, T. et al., 2012. Ryanodine receptor antagonists adapt NPC1 proteostasis to

- ameliorate lipid storage in Niemann-Pick type C disease fibroblasts. *Human Molecular Genetics*, 21(14), pp.3205–3214.
- Yu, W., Jin, H. & Huang, Y., 2021. Mitochondria-associated membranes (MAMs): A potential therapeutic target for treating Alzheimer's disease. *Clinical Science*, 135(1), pp.109–126.
- Yuan, J., Lipinski, M. & Degterev, A., 2003. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron*, 40(2), pp.401–413.
- Zamzami, N. et al., 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(2), pp.367–377.
- Zhao, F. et al., 2001. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), pp.13810–13816.
- Zhao, F. et al., 2021. Mfn2 Overexpression Attenuates MPTP Neurotoxicity In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), p.601.
- Zhao, R.-Z. et al., 2019. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International journal of molecular medicine*, 44(1), pp.3–15.
- Zheng, X. et al., 2016. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *eLife*, 5.
- Zhu, X. et al., 2017. Mfn2 protects dopaminergic neurons exposed to paraquat both in vitro and in vivo: Implications for idiopathic Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(6), pp.1359–1370.
- Zorova, L.D. et al., 2018. Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, 552, pp.50–59.
- Zorzano, A. et al., 2010. Mitochondrial fusion proteins: Dual regulators of morphology and metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(6), pp.566–574.
- Zorzano, A. & Claret, M., 2015. Implications of mitochondrial dynamics on neurodegeneration and on hypothalamic dysfunction. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(7).
- Zsurka, G. & Kunz, W.S., 2015. Mitochondrial dysfunction and seizures: the neuronal energy crisis. *The Lancet Neurology*, 14(9), pp.956–966.
- Züchner, S. et al., 2006. Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Annals of Neurology*, 59(2), pp.276–281.
- Züchner, S. et al., 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature genetics*, 36(5), pp.449–51.

ANEXO



Como resultado de esta tesis doctoral se ha elaborado el siguiente artículo (aún en revisión):

Casellas-Díaz, S., Larramona-Arcas, R., Riqué-Pujol, G., Tena-Morraja, P., Müller-Sánchez, C., Segarra-Mondéjar, M., Gavalda-Navarro, A., Villaroya F., Reina, M., Martínez-Estrada, O.M., Soriano, F.X. (En revisión). *Mfn2 localization in the ER is necessary for its bioenergetic function and neuritic development*. EMBO Reports.

Además, durante la realización de esta tesis doctoral también se ha colaborado en la publicación del siguiente artículo:

Segarra-Mondéjar, M., **Casellas-Díaz, S.**, Ramiro-Pareta, M., Müller-Sánchez, C., Martorell-Riera, A., Hermelo, I., Reina, M., Aragonés, J., Martínez-Estrada, O.M., Soriano, F.X. (2018). *Synaptic activity-induced glycolysis facilitates membrane lipid provision and neurite outgrowth*. The EMBO Journal.