



Efectes de la proteïna Mitofusina 2 sobre el metabolisme muscular

Jessica Segalés Dalmau

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) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.

Programa de Doctorat de Biomedicina, bienni 2004-2006

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona i

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

EFFECTES DE LA PROTEÏNA MITOFUSINA 2 SOBRE EL METABOLISME MUSCULAR

Memòria per optar al grau de Doctora per la Universitat de
Barcelona, presentada per:

Jessica Segalés Dalmau

El Director:

La Doctoranda:

Dr. Antonio Zorzano Olarte

Jessica Segalés Dalmau

AGRAÏMENTS

Han estat molts anys de feina, i ara que la tesi ja està escrita, és el moment d'agrair l'ajuda, el suport i la col·laboració de totes les persones sense les quals hagués estat impossible realitzar-la.

En primer lloc, moltes gràcies a l'Antonio per permetre'm treballar en el seu equip i donar-me l'oportunitat de realitzar la tesi doctoral. Y al Manuel, l'altre pilar del grup d'Insulina, muchas gracias por tus comentarios y consejos en los seminarios de grupo.

A tots els INSULINOS!!! L'avantatge d'un grup tan gran és la quantitat i diversitat de persones que hi passen, de totes se'n pot aprendre alguna cosa, tant a nivell professional com personal.

Als més veterans quan vaig entrar, tant els que heu seguit el vostre propi camí: Josep Chillarón, Raúl, Perla i Luc, com les que continueu vinculades al grup: Anna Gumà i Marta Camps. Heu estat els referents de tots els que començàvem!! Moltíssimes gràcies per respondre tots els dubtes i estar disposats a donar un cop de mà! Moltes gràcies també Marta, per preocupar-te per mi i preguntar sempre com anaven els projectes. A la Manu, la super mama del grup i pràcticament tan veterana com tots ells; la bondat personificada, si n'hi haguessin més com tu les coses anirien molt millor!!

Als mitofuseros, amb els que hem compartit reunions, resultats desastrosos i altres encara més desastrosos, i també alguna alegria!! Sara Pich!!!! La persona que em va ensenyar a fer un Western Blot, a transfectar cèl·lules, a immunoprecipitar i tantes altres coses..., la primera mestra vaja!! Uns quants anys i més de 200 WB més tard, per fi estic a punt de ser doctora!! Gràcies per ensenyar-me, i pel teu optimisme i bon humor. Al Francesco, l'altre veterà del grup, i una de les primeres defenses de tesi a les que vaig assistir. Vam coincidir durant poc temps, però era un plaer veure't treballar i sentir-te parlar de ciència. A José Carlos, trabajador y luchador incansable, y por encima de todo, una gran persona en quién se podía confiar y hablar de todo. Te deseo mucha suerte en tu postdoc, te la mereces!! A Sergio, aunque tuviéramos nuestras diferencias, en este mundo cada vez más hipócrita agradezco mucho tu sinceridad, el decir siempre lo que piensas y el estar dispuesto a ayudar a todos los que te lo pedíamos. Aquí hay más gente que te echa de menos de la que crees!!! Déborah y Maribel, mis compañeras de ordenador y viajecitos..., no os podéis ni imaginar lo que he aprendido a vuestro lado, y no sólo de ciencia!! Al Marc, el científic més complet que ha passat per aquest

laboratori, treballador, rigorós, intel·ligent i sobretot, molt bona persona. Moltes gràcies per ajudar sempre als que veníem darrere, ets un exemple a seguir. A David y Eleonora, mis compañeros de proyecto en esta última etapa de la tesis. Ha sido un placer trabajar a vuestro lado, creo que formábamos un gran equipo. David, gracias por ayudarme en todo, por tus explicaciones sobre metabolismo, ROS, y especialmente, por tu positivismo, fuerza y energía para seguir adelante con nuestro “supermodelo” *knockout*; si no llega a ser por ti, creo que hubiera hecho un ratonicidio!!! Y a ti Eleonora, gracias por tu fantástica planificación y organización del trabajo, por ser tan buena, y escucharme y tranquilizarme en los momentos de crisis, que no han sido pocos! A les noves incorporacions: Edu i M^a Àngels, molts ànims pels vostres projectes; Edu, no perdís el sentit de l’humor, i tu M^a Àngels, no canviïs mai, fan falta més persones amb la teva bondat.

A tots els que estaven fent la tesi quan vaig començar i mica en mica s’han anat convertint en grans doctors i doctores: Maite, César, Joana, Meritxell Orpinell, increïble la teva capacitat de treball, només tu podies fer 16 WB a la vegada i sense equivocar-te!! Al Carles, un crack i un apassionat de la ciència, moltes gràcies per la teva ajuda, ànims i consells. Al Jordi, el meu company de poiata i al Hans, una de les persones més intel·ligents que he conegut mai. A Paola, la chica más dulce del laboratorio, gracias por tu apoyo, por preocuparte siempre de los demás, te mereces lo mejor. A Elena, otro ejemplo de lucha y superación, muchas gracias por animarme en los malos momentos y por ser la alegría del lab!! Espero que te vaya todo muy bien. A la Sílvia, tan discreta i treballadora que semblava que no hi fos, però que es troba a faltar moltíssim ara que no hi és. Moltes gràcies per estar sempre disposada a ajudar, a resoldre dubtes, parlar de ciència i del que fes falta. A l’Esther, una gran investigadora i una bona amiga dins i fora del laboratori, moltíssima sort en la teva aventura americana!! A la Lorena i la Susanna Bodoy, gràcies pels vostres ànims i consells, sobretot a l’última etapa de la meva tesi. A la Mercè, una de les persones més vàlides i treballadores que ha passat pel grup, a més de preocupar-se sempre per tothom i ajudar en tot el que podia, ets un encant!! Al Víctor, relacions públiques del laboratori amb un gran do de comunicació; i de postdoc a Sudàfrica, tu si que en saps nen!!!!

A les que com jo, ja esteu a l’última etapa de la tesi: Laura, Sonia i Caroline. Sembla que no pugui ser, després de tants anys, però ja la tenim!!! Això s’haurà de celebrar!!

Al Vicente i a l’Ana Sancho, molts ànims que a vosaltres també us falta poc per escriure!! Al David Sala, ets el millor, becari!! Segueix treballant com sempre i no

perdis el teu gran rigor. Potser no dóna resultats a curt termini, però és la manera d'aprendre i d'intentar fer les coses ben fetes. Jo he après molt de tu!! A la Meri, companya de poiata d'aquests últims anys, molts ànims nena, que ja gairebé ho tens això!!! Als nous becaris, alguns potser no tant nous, però és que el temps passa volant: Gonzalo, Arturo, Elena, Yuliana, molta sort en els vostres projectes.

A tots els postdocs que s'han anat incorporant i han aportat la seva experiència al grup: Eva, José Luis, Lukasz, Ekaitz, Saska, Jana, Juan Pablo, el teòric de la ciència, gracias por tus charlas y explicaciones sobre posibles mecanismos, y por ayudar siempre a todo el mundo. Has sido uno de los mejores fichajes. Y a Montse, gracias por ser cómo eres, por demostrar que aún queda gente honesta y con ganas de hacer que las cosas mejoren. Sigue luchando por ello.

A tots els tècnics que han passat pel laboratori i que amb la seva feina ens han facilitat la nostra: la Ruth, la millor organitzadora de festes i sopars, nena que això ha canviat molt des que vas marxar a Berlín!!, l'Eli, el Juan Carlos, la Susanna Bial, quina marassa estàs feta!! I els dos nous fitxatges: Jordi, per fi un altre badaloní!!, i Nacho, muchas gracias por interesarte por cómo estaba y cómo iba la escritura. Natàlia!! Mai et podrem agrair prou la feina que has fet, no sé què haguéssim fet sense la teva ajuda a l'estabulari!!! Moltes gràcies per portar el control de les colònies, per donar-nos un cop de mà amb els GTTs, els dies de matança..., i per ser una persona genial! Miriam, tu ets molt més que una tècnica de laboratori, ets una bona amiga, gràcies per la teva ajuda, per saber que puc comptar amb tu en els bons i en els mals moments. A més de la meua companya d'artisteo!! Vam començar les classes de dansa del ventre al mateix temps que aquesta tesi, i aquí seguim, al peu del canó. I no cal que et digui què ha estat més productiu, oi? Encara ens ho haurem de repensar això de muntar el "xiringo" i donar classes; potser ens guanyaríem millor la vida!!!

Al David Verde, pel teu gran sentit de l'humor, per les classes de teatre amb l'Esther i per estar sempre allà quan et necessitàvem. Un gran company!! A la Judith, gràcies per la teua energia contagiosa, per donar-nos ànims quan ens veies decaiguts i per dir sempre el què penses. A l'Olga, pel teu bon humor i per donar una mica de vidilla al laboratori quan fa falta. A la Natàlia Molner i la Chiara, per la seva amabilitat i eficiència. Per cert Chiara, ens va quedar una partida de ping-pong pendent, eh!!! A tots vosaltres, gràcies per ajudar-nos en els temes administratius, beques, contractes...

Als que no hem coincidit tant de temps, però amb qui també hem passat bons moments: Andreia, Reini, Jonàs, Meri peque, gràcies per tot.

A Óscar, la persona que más me ayudó cuando llegué al laboratorio. Muchas gracias por tu paciencia, por estar siempre a mi lado, por intentar animarme cuando todo salía mal y especialmente, por confiar más en mí de lo que yo he hecho jamás. Es un lujo tenerte como amigo.

Vicent, padrí!!! Gràcies per tantes coses!! Pel teu peculiar sentit de l'humor, amb el que et vas guanyar l'eterna nominació, per fer que les hores a l'estabulari passessin més de pressa, pels teus consells, pels dinars i cafès amb l'Albert, i sobretot les sobretaules, parlant de ciència, de la vida i intentant arreglar el món!! Ai, quins padrins, encara més innocents que la fillola!! I mira ara, tu un gran científic a Los Angeles i la Srta. Segalés a punt de ser doctora!!

Al grupo de José Antonio Enríquez, muy especialmente a Patricio y Ester, por su ayuda en el tema de los supercomplejos y por su amabilidad durante las semanas que pasé en Zaragoza.

A les amigues de la Universitat, Anna, Maria, Noe, Núria, Sara i Sílvia, pels nostres sopars explicant-nos les aventures i desventures professionals. Us desitjo el millor a totes, a tots els nivells, i felicitats especialment a l'Anna i la Sílvia, sereu unes mares increïbles!!!!

A l'Alba i al Pedro, el tema científic us queda molt lluny, però gràcies per preguntar sempre com anaven les coses i com estaven les meves "mascotes"!

A l'Albert, gràcies per la teva paciència, pels teus ànims i consells, per creure en mi i pensar que serveixo per aquesta feina, pel teu suport, per ajudar-me a tirar endavant. Si no fos per tu, fa anys que ho hauria deixat. Aquesta tesi és mig teva!! Gràcies també per veure'm com un personatge curiós i no com un "bitxo raro", per fer-me sentir especial i per sentir-te tan a prop meu fins i tot ara que estàs a milers de quilòmetres d'aquí. Gràcies per tot.

Per últim, però el més important, gràcies a la meva família. Al meu germà i als meus pares. Gràcies pel vostre amor i suport incondicional, per ajudar-me en tot, per posar-m'ho tot més fàcil, per saber com m'ha anat el dia només obrir la porta de casa, per recolzar-me en totes les decisions que he pres. No us podré agrair mai prou tot el que heu fet per mi. Ja sé que no ho dic gaire, però us estimo moltíssim.

CONTINGUTS

ÍNDIX DE CONTINGUTS

Índex	I
Índex de figures i taules	VII
Abreviatures	XI

INTRODUCCIÓ

1

A) BIOENERGÈTICA MITOCONDRIAL

2

A.1) La cadena de transport d'electrons i la fosforilació oxidativa

2

A.1.1) Components del sistema OXPHOS

3

A.1.2) Organització del sistema OXPHOS

4

A.1.3) Producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS)

6

B) DINÀMICA MITOCONDRIAL

6

B.1) Fusió mitocondrial i proteïnes implicades

7

B.2) Fissió mitocondrial i proteïnes implicades

9

B.3) Relació entre la dinàmica i la funció mitocondrial

10

C) MITOFUSINA 2

12

C.1) Dominis i activitat de mitofusina 2 humana

13

C.2) Regulació de Mfn2. *Partners* i moduladors de la seva activitat

14

C.3) Paper fisiològic de Mfn2

15

C.3.1) Implicació de Mfn2 en la proliferació cel·lular i en l'apoptosi

16

C.3.2) Paper de Mfn2 en la interacció mitocondris-reticle endoplasmàtic

17

C.3.3) Paper de Mfn2 en el metabolisme mitocondrial

17

C.4) Implicació de Mfn2 en diferents patologies

19

C.4.1) Charcot-Marie-Tooth de tipus 2A (CMT2A)

19

C.4.2) Paper potencial de Mfn2 en la patofisiologia de l'obesitat i la diabetis de tipus 2

21

C.5) La forma truncada de Mfn2 humana (hMfn2 Δ 614-757)

23

OBJECTIUS

25

RESULTATS

27

A) ESTUDI DEL PAPER FISIOLÒGIC DE MITOFUSINA 2 EN EL MODEL CEL·LULAR C2C12

27

A.1) Model utilitzat

27

A.2) Estudi dels efectes de la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 sobre el metabolisme de les cèl·lules C2C12	28
A.2.1) Comprovació de l'eficiència de transducció	28
A.2.2) Efectes de la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en la taxa de consum d'oxigen	29
A.2.3) Efectes de la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en el potencial de membrana mitocondrial	33
A.2.4) Efectes de la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en l'oxidació de palmitat	33
A.2.5) Efectes de la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en l'expressió de subunitats dels complexos de la cadena respiratòria	34
A.3) Estudi dels efectes de la repressió de Mfn2 sobre el metabolisme de les cèl·lules C2C12	36
A.3.1) Comprovació de l'eficiència de transducció	36
A.3.2) Efectes de la repressió de Mfn2 en la taxa de consum d'oxigen	37
A.3.3) Efectes de la repressió de Mfn2 en el potencial de membrana mitocondrial	39
A.3.4) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'expressió de subunitats dels complexos de la cadena respiratòria	40
B) ESTUDI DELS EFECTES DE L'EXPRESSIÓ DE LA FORMA TRUNCADA hMfn2Δ614-757 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC	42
B.1) Descripció i validació del model utilitzat	42
B.1.1) Optimització de la tècnica d'electrotransferència d'ADN	42
B.1.2) Generació i validació del model d'expressió transitòria de la forma hMfn2 Δ 614-757 en múscul esquelètic	43
B.2) Fenotip general del model <i>in vivo</i> d'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757	44
B.3) Fenotip a nivell de múscul esquelètic del model <i>in vivo</i> d'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757	47
B.3.1) Efectes de l'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en l'abundància i la morfologia mitocondrial	47
B.3.2) Efectes de l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en l'oxidació de glucosa	49
B.3.3) Efectes de l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en la taxa de consum d'oxigen	50
B.3.4) Efectes de l'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria	53
B.3.5) Efectes de l'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en l'expressió de subunitats dels complexos de la cadena respiratòria	55
B.3.6) Efectes de l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en la formació i estabilitat dels complexos i supercomplexos de la cadena respiratòria	56

C) ESTUDI DELS EFECTES DE LA REPRESSIÓ DE MITOFUSINA 2 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC	61
C.1) Generació i validació del model de repressió transitòria de Mfn2 en múscul esquelètic	61
C.2) Generació i validació del model de repressió permanent de Mfn2 en múscul esquelètic (Mfn2 KO)	63
C.3) Fenotip general del model Mfn2 KO	64
C.3.1) Fenotip dels ratolins Mfn2 KO en condicions basals	64
C.3.2) Efecte de l'edat sobre el fenotip dels ratolins Mfn2 KO	66
C.3.3) Efecte de la dieta rica en greixos sobre el fenotip dels ratolins Mfn2 KO	67
C.4) Fenotip a nivell muscular del model <i>in vivo</i> de la repressió de Mfn2	68
C.4.1) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'abundància i la morfologia mitocondrial	68
C.4.2) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'expressió d'altres proteïnes implicades en dinàmica mitocondrial	70
C.4.3) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'oxidació de glucosa	71
C.4.4) Efectes de la repressió de Mfn2 en la taxa de consum d'oxigen	72
C.4.5) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria	75
C.4.6) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'expressió de subunitats dels complexos de la cadena respiratòria	77
C.4.7) Efectes de la repressió de Mfn2 en la formació i estabilitat dels complexos i supercomplexos de la cadena respiratòria	78
 DISCUSSIÓ	81
A) EXPRESSIÓ DE LA FORMA hMfn2Δ614-757	81
A.1) Efectes sobre el metabolisme mitocondrial en cèl·lules C2C12	81
A.2) Efectes sobre el metabolisme mitocondrial en múscul esquelètic	84
B) REPRESSIÓ DE MITOFUSINA 2	88
B.1) Efectes sobre el metabolisme mitocondrial en cèl·lules C2C12	88
B.2) Efectes sobre el metabolisme mitocondrial en múscul esquelètic	91
 CONCLUSIONS	99
 MATERIALS I MÈTODES	101
A) CULTIUS CEL·LULARS	101
A.1) Línies cel·lulars i medis de cultiu	101
A.1.1) Línies cel·lulars	101

A.1.2) Medis de cultiu	102
A.1.2.1) Preparació dels medis de cultiu	102
A.2) Tècniques generals de cultius cel·lulars	103
A.2.1) Subcultius de manteniment	103
A.2.2) Congelació i descongelació de cèl·lules	104
A.2.3) Comptatge de cèl·lules amb la cambra de Neubauer	105
A.2.4) Detecció de micoplasma en cultius cel·lulars	106
A.3) Transducció de cèl·lules C2C12 amb adenovirus recombinants	106
A.3.1) Amplificació i titulació dels adenovirus	107
A.3.2) Diferenciació de cèl·lules C2C12 i transducció amb adenovirus	108
B) ESTUDIS METABÒLICS EN MIOTUBS C2C12	110
B.1) Experiments de respirometria	110
B.1.1) Mesura de la taxa de consum d'oxigen (OCR)	111
B.1.1.1) Protocol de respirometria	112
B.2) Mesura del potencial de membrana mitocondrial	114
B.3) Mesura de l'oxidació de palmitat	115
C) MODELS ANIMALS	119
C.1) Generació dels models murins per electrotransferència d'ADN a múscul esquelètic	119
C.1.1) Plàsmids utilitzats per a l'electrotransferència	120
C.1.1.1) Sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	120
C.1.1.2) Repressió de Mfn2 mitjançant l'ús de microRNA	121
C.1.1.3) Amplificació i purificació dels plàsmids	122
C.1.2) Electrotransferència dels plàsmids al múscul esquelètic	123
C.1.2.1) Sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	123
C.1.2.2) Repressió de Mfn2	123
C.1.2.3) Protocol d'electrotransferència d'ADN	124
C.1.3) Seguiment <i>in vivo</i> de l'eficiència de l'electrotransferència	124
C.2) Generació del model de repressió permanent de Mfn2 en múscul esquelètic (Mfn2 KO)	125
C.2.1) Comprovació dels ratolins Mfn2 KO per genotipació	126
C.2.1.1) Obtenció d'ADN genòmic a partir de cues de ratolí	126
C.2.1.2) Genotipació	127
D) ESTUDIS <i>IN VIVO</i>	129
D.1) Test de tolerància a la glucosa (GTT)	129
D.2) Test de tolerància a la insulina (ITT)	130

D.3) Test de coordinació motora	130
E) ESTUDIS <i>EX VIVO</i> DE LA FUNCIÓ I EL METABOLISME MITOCONDRIAL EN MÚSCUL ESQUELÈTIC	131
E.1) Assajos enzimàtics	132
E.1.1) Obtenció d'homogenats del múscul tibialis anterior per la mesura d'activitats enzimàtiques	132
E.1.2) Activitat citrat sintasa (CS)	133
E.1.3) Activitat del complex I (NADH: Q ₁₀ oxidoreductasa)	134
E.1.4) Activitat del complex II (Succinat deshidrogenasa)	135
E.1.5) Activitat del complex III (Decilubiquinona: citocrom c oxidoreductasa)	136
E.1.6) Activitat del complex IV (Citocrom c oxidasa)	137
E.1.7) Activitat del complex V (ATP sintasa)	138
E.1.8) Activitat dels complexos I + CoQ ₁₀ + III (NADH: citocrom c oxidoreductasa sensible a la rotenona)	140
E.1.9) Activitat dels complexos II + CoQ ₁₀ + III (Succinat: citocrom c oxidoreductasa)	141
E.2) Respirimetria en fibres musculars permeabilitzades	142
E.2.1) Equipament necessari, manteniment i calibració instrumental	143
E.2.1.1) Calibració de l' <i>oxygraph-2k</i>	144
E.2.1.2) Neteja de les cambres de l' <i>oxygraph-2k</i>	146
E.2.2) Protocol de respirimetria	146
E.2.2.1) Preparació dels medis per a la permeabilització de les fibres musculars	146
E.2.2.2) Permeabilització de les fibres musculars	147
E.2.2.3) Mesura del consum d'oxigen amb l' <i>oxygraph-2k</i>	148
E.2.2.4) Càlculs i anàlisi de dades	150
E.3) Anàlisi de l'oxidació de glucosa	151
E.4) Anàlisi de la incorporació de glucosa a glicogen	153
F) TÈCNiques DE DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES	154
F.1) Obtenció d'extractes totals i fraccionament subcel·lular	154
F.1.1) Obtenció de fraccions enriquides en mitocondris a partir de cèl·lules ..	154
F.1.2) Obtenció de fraccions mitocondrials de múscul esquelètic de ratolí	156
F.2) Determinació de la concentració de proteïnes	157
F.3) Anàlisi dels nivells de proteïna mitjançant <i>Western Blot</i>	158
F.3.1) Electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants.....	158
F.3.1.1) Preparació i polimerització dels gels	159
F.3.1.2) Preparació de les mostres	159
F.3.1.3) Electroforesi	160

F.3.2) Transferència de les proteïnes a membranes de PVDF	160
F.3.3) Immunodetecció de la proteïna d'interès	161
F.4) Electroforesi en condicions natives: <i>Blue Native</i>-PAGE	163
F.4.1) Obtenció de fraccions mitocondrials a partir de múscul esquelètic de ratolí per l'anàlisi <i>Blue Native</i> -PAGE	164
F.4.2) Preparació dels gels de gradient	165
F.4.3) Preparació de les mostres	166
F.4.4) Electroforesi en condicions natives	167
F.4.5) <i>Western Blot</i>	167
F.5) <i>Stripping</i>	168
F.6) Anàlisi densitomètrica	168
F.7) Microscopia electrònica de transmissió	169
G) TÈCNiques DE DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS	171
G.1) Vectors plasmídics: amplificació i purificació	171
G.1.1) Transformació de bacteris competents per xoc tèrmic	171
G.1.2) Purificació de plàsmids a partir de cultius bacterians	172
G.2) Electroforesi en gels d'agarosa	172
G.3) <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	173
G.3.1) Disseny dels encebadors	173
G.3.2) Etapes de la PCR i components de la reacció	173
G.4) <i>Real Time</i> PCR (RT-PCR)	174
G.4.1) Obtenció d'ARN total i síntesi de cDNA	174
G.4.1.1) Obtenció d'ARN total a partir de cèl·lules C2C12	175
G.4.1.2) Obtenció d'ARN total a partir de múscul esquelètic de ratolí	175
G.4.1.3) Síntesi de cDNA a partir d'ARN total	176
G.4.2) Fonament de la RT-PCR i mètodes de quantificació	176
G.4.3) RT-PCR utilitzant <i>Sybr Green</i>	178
G.4.3.1) Disseny dels encebadors	178
G.4.3.2) Procediment	179
G.4.4) RT-PCR utilitzant <i>TaqMan</i>	179
G.4.5) Gens <i>housekeeping</i> i controls negatius	180
G.4.6) Càlcul de l'expressió gènica	180
G.5) Quantificació de l'ADN mitocondrial per RT-PCR	181
G.5.1) Obtenció d'ADN total a partir de múscul esquelètic	181
G.5.2) Disseny dels encebadors, procediment i càlcul	181
BIBLIOGRAFIA	183

ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

FIGURES

INTRODUCCIÓ

1- Ultraestructura dels mitocondris	1
2- Esquema del sistema OXPHOS	3
3- Representació esquemàtica dels models d'organització del sistema OXPHOS	5
4- Maquinària de fusió mitocondrial	8
5- Maquinària de fissió mitocondrial	10
6- Representació esquemàtica dels dominis i de la topologia de Mfn2	13
7- Efectes de la repressió de Mfn2 en miotubs L6E9	18
8- Expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en cèl·lules HeLa	24

RESULTATS

9- Comprovació de la diferenciació de les cèl·lules C2C12	27
10- Expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en miotubs C2C12	29
11- Mesura del consum d'oxigen en miotubs C2C12	30
12- Efecte de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre el consum d'oxigen en miotubs C2C12	31
13- Efecte de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre el consum d'oxigen mitocondrial en miotubs C2C12	31
14- Efecte de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 en les <i>Flux</i> <i>Control Ratios</i> en miotubs C2C12	32
15- Efecte de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) en cèl·lules C2C12	33
16- Efecte de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 en l'oxidació de palmitat en miotubs C2C12	34
17- Efecte de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre l'expressió dels complexes de la cadena respiratòria en cèl·lules C2C12	35
18- Repressió de Mfn2 en miotubs C2C12	36
19- Experiment representatiu de la mesura del consum d'oxigen en miotubs C2C12 en reprimir Mfn2	37
20- Efecte de la repressió de Mfn2 sobre el consum d'oxigen en miotubs C2C12	38
21- Efecte de la repressió de Mfn2 sobre el consum d'oxigen mitocondrial en miotubs C2C12	38
22- Efecte de la repressió de Mfn2 en les <i>Flux Control Ratios</i> en cèl·lules C2C12	39
23- Efecte de la repressió de Mfn2 en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) de cèl·lules C2C12	40

24- Efecte de la repressió de Mfn2 sobre l'expressió dels complexos de la cadena respiratòria en miotubs C2C12	41
25- Eficiència de l'electrotransferència d'ADN en funció del tipus de múscul	43
26- Expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en múscul esquelètic de ratolí	44
27- Test de tolerància intraperitoneal a la glucosa (GTT) del model <i>in vivo</i> d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	45
28- Nivells d'insulina durant el GTT en el model <i>in vivo</i> d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	45
29- Nivells de glucosa i d'insulina circulants en el model <i>in vivo</i> d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	46
30- Increment de pes en el model <i>in vivo</i> d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	46
31- Pes de diferents teixits respecte al pes corporal en el model <i>in vivo</i> d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	47
32- Quantificació de l'ADN mitocondrial mitjançant <i>real-time</i> PCR en el model <i>in vivo</i> d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	48
33- Anàlisi per microscopia electrònica de transmissió de tibialis anterior provinents del model <i>in vivo</i> d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	48
34- Efecte de l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 en l'oxidació de glucosa en múscul esquelètic	49
35- Mesura del consum d'oxigen en fibres musculars permeabilitzades del model <i>in vivo</i> d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	51
36- Efecte de l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre el consum d'oxigen mitocondrial en fibres musculars permeabilitzades	52
37- Mesura de la <i>Respiratory Control Ratio</i> (RCR)	52
38- Activitat enzimàtica de la citrat sintasa	53
39- Efecte de l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre les activitats enzimàtiques dels complexos de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa	54
40- Efecte de l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre els nivells de proteïna dels complexos de la cadena respiratòria	55
41- Efecte de l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre els nivells d'ARN missatger dels complexos de la cadena respiratòria	56
42- <i>Blue Native</i> PAGE de mitocondris solubilitzats amb DDM	57
43- <i>Blue Native</i> PAGE de mitocondris solubilitzats amb digitonina	57
44- Quantificació dels complexos de la cadena respiratòria solubilitzats amb digitonina	58
45- Detecció dels supercomplexes en assajos de BN-PAGE de fraccions mitocondrials de tibialis anterior solubilitzades amb digitonina	59
46- Quantificació dels complexos de la cadena respiratòria solubilitzats amb DDM	60
47- Comprovació de l'expressió dels miRNA	61
48- Repressió de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic mitjançant electrotransferència d'ADN	62
49- Expressió de Mfn2 en el model Mfn2 KO	63
50- Assajos de coordinació motora en el model Mfn2 KO	64

51- Pes corporal i pes del teixit adipós epididimal dels ratolins Mfn2 KO	65
52- GTT del model Mfn2 KO	65
53- Efecte de l'edat en el fenotip dels ratolins Mfn2 KO	66
54- Pes corporal i pes del teixit adipós epididimal dels ratolins Mfn2 KO sotmesos a una dieta rica en greixos	67
55- Test de tolerància intraperitoneal a la glucosa en ratolins Mfn2 KO sotmesos a una dieta rica en greixos	67
56- Quantificació de l'ADN mitocondrial mitjançant <i>real-time</i> PCR	69
57- Anàlisi per microscopia electrònica de transmissió de quàdriceps del model Mfn2 KO	69
58- Efecte de la repressió de Mfn2 en l'expressió d'altres proteïnes implicades en dinàmica mitocondrial	70
59- Efecte de la repressió de Mfn2 en l'oxidació de glucosa en múscul esquelètic	71
60- Efecte de la repressió de Mfn2 en la incorporació de glucosa a glicogen	72
61- Mesura del consum d'oxigen en fibres musculars permeabilitzades del model Mfn2 KO.....	73
62- Efecte de la repressió de Mfn2 sobre el consum d'oxigen mitocondrial en fibres musculars permeabilitzades	74
63- <i>Respiratory Control Ratio</i> (RCR) del model Mfn2 KO.....	75
64- <i>Succinate Control Ratio</i> (SCR) del model Mfn2 KO	75
65- Activitat enzimàtica de la citrat sintasa en el model de repressió transitòria de Mfn2	76
66- Efecte de la repressió de Mfn2 sobre les activitats enzimàtiques dels complexos de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa	77
67- Efecte de la repressió de Mfn2 sobre els nivells de proteïna dels complexos de la cadena respiratòria	78
68- Efecte de la repressió de Mfn2 sobre els nivells d'ARN missatger dels complexos de la cadena respiratòria	78
69- Quantificació dels complexos de la cadena respiratòria solubilitzats amb digitonina del model Mfn2 KO	79
70- Detecció dels supercomplexos en assajos de BN-PAGE de fraccions mitocondrials de gastrocnemis solubilitzades amb digitonina	80
71- Quantificació dels complexos de la cadena respiratòria solubilitzats amb DDM del model Mfn2 KO	80

DISCUSSIÓ

72- Model de l'estimulació del metabolisme mitocondrial en múscul esquelètic per l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757	88
73- Augment de la susceptibilitat a desenvolupar resistència a la insulina degut a la repressió de Mfn2	97

MATERIALS I MÈTODES

74- Procediment de diferenciació i transducció de cèl·lules C2C12	108
75- Exemple de la mesura de l'OCR en diferents estats respiratoris en cèl·lules	111
76- Mapa del constructe pSP-CMVSV40-hMfn2 Δ 614-757	121
77- Mapa del constructe pcDNA6.2-Gw/EmGFP-miRNAMfn2	122
78- <i>In Vivo Imaging System</i> (IVIS)	125
79- Genotipació del model KO de Mfn2	128
80- OROBOROS <i>Oxygraph-2k</i>	144
81- Exemple de calibració dels sensors polarogràfics d'oxigen	145
82- Exemple de calibració instrumental	145
83- Permeabilització mecànica de les fibres musculars	148
84- Protocol de respirometria en fibres musculars permeabilitzades	150
85- Esquema del muntatge dels taps de goma amb el paper de filtre saturat amb KOH 0,1M	152

TAULES

1- Tampó KRBH: <i>Krebs-Ringer bicarbonate Hepes buffer</i>	118
2- Seqüència dels encebadors utilitzats en la genotipació dels ratolins Mfn2 KO	127
3- Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat citrat sintasa	134
4- Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat NADH: Q ₁₀ oxidoreductasa	135
5- Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat succinat deshidrogenasa	136
6- Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat decilubiquinona: citocrom c oxidoreductasa	137
7- Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat citocrom c oxidasa	138
8- Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat ATP sintasa	139
9- Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat NADH: citocrom c oxidoreductasa sensible a la rotenona	140
10- Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat succinat: citocrom c oxidoreductasa	141
11- Composició dels medis MiR05 i BIOPS	147
12- Anticossos primaris utilitzats en aquesta tesi doctoral	163
13- Solucions per a la preparació dels gels de BN-PAGE	166
14- Seqüència dels encebadors utilitzats per a la quantificació de l'ADN mitocondrial	182

ABREVIATURES

Adv: Adenovirus
ADN: Àcid desoxiribonucleic
ADNmt: ADN mitocondrial
ADP: Adenosina difosfat
ANT: *Adenine Nucleotide Translocase*
APS: Persulfat d'amoni
ARN: Àcid ribonucleic
ARP: *Acidic Ribosomal Protein*
ATCC: *American Type Culture Collection*
ATP: Adenosina trifosfat
Atp5a1: ATP sintasa (complex V) subunitat alpha 1
BCA: Àcid bicinconínic
BIOPS: *Biopsy Preservation Solution*
BN PAGE: *Blue Native PAGE*
BSA: Albúmina de sèrum boví
CC: *Domini coiled-coil*
CCCP: Carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona
cdNA: ADN codificant obtingut de la retrotranscripció de l'ARN missatger.
CMT2A: *Charcot- Marie Tooth type 2A*
CMV: Citomegalovirus.
CoA: Coenzim A
CoQ: Coenzim Q o Ubiquinona
COX I: Citocrom c oxidasa subunitat I
COX IV: Citocrom c oxidasa subunitat IV
CS: Citrat sintasa
DBH₂: Decilubiquinol
DCPIP: 2,6-diclorofenol indofenol
DDM: Dodecil- β -D-maltòsid
DMEM: *Dulbecco Modified Eagle's Medium*
DMSO: Dimetilsulfòxid
Drp1: *Dynamain related protein 1*
DTNB: Àcid ditionitrobenzoic
DTT: Ditiotreitòl.
 $\Delta\Psi$: Diferència de potencial de membrana mitocondrial
EDTA: Àcid etilen-diamino-tetraacètic
EGTA: Àcid etilen-glicol-tetraacètic
ERR α : *Estrogen Related Receptor α*
FADH₂: Dinucleòtid de flavina i adenina, forma reduïda
FBS: Sèrum fetal boví
FCCP: Carbonilcianida-p- trifluorometoxifenilhidrazona
Fis1: *Fission homologue 1*
GMN: Consum d'oxigen amb glutamat i malat
GMD: Consum d'oxigen amb glutamat, malat i ADP
GMDS: Consum d'oxigen amb glutamat, malat, ADP i succinat
GTP: Guanosina trifosfat
GTPasa: Proteïna que hidrolitza GTP.

HEPES: Àcid 2-[4(2-Hydroxyethyl)-1-Piperaziny] Ethanesulphonic (tamponador pH)
IL-6: Interleuquina 6
KBH₄: Borhidrat de potassi
KCN: Cianur potàssic
KO: *knockout*
KRBH: Tampó Krebs-Ringer Bicarbonat Hepes
LDH: Lactat deshidrogenasa
MEFs: Fibroblasts embrionaris de ratolí
Mfn1: Mitofusina 1
Mfn2: Mitofusina 2
MiR05: *Mitochondrial Respiration Medium*
miRNA: microRNA
MME: Membrana mitocondrial externa
MMI: Membrana mitocondrial interna
MMRRC: *Mutant Mouse Regional Resource Centers*
mRNA: ARN missatger
MTP18: *Mitochondrial protein 18 kDa*
NAD⁺: Dinucleòtid de nicotinamida i adenina, forma oxidada
NADH: Dinucleòtid de nicotinamida i adenina, forma reduïda
NaN₃: Azida sòdica
nDNA: ADN nuclear
Ndufa9: Subunitat NADH deshidrogenasa 1 alfa (complex I)
OCR: Taxa de consum d'oxigen
OPA1: *Optic Atrophy gene 1*
PBS: Tampó fosfat salí
PCR: Reacció en cadena de la polimerasa
PEP: Fosfoenol piruvat
PGC-1: *Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1*
Pi: Fosfat inorgànic
PK: Piruvat cinasa
PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
RCR: *Respiratory Control Ratio*
ROS: Espècies reactives d'oxigen
rox: *residual oxygen consumption* o consum d'oxigen no mitocondrial
SCR: *Succinate Control Ratio*
Sdha: Succinat deshidrogenasa subunitat alfa (complex II)
SDS: Dodecil sulfat sòdic
TEMED: Tetrametiletilediàmina
TMRM: Tetrametilrodamina metil ester
TNB: Àcid tionitrobenzoic
TNF α : Factor de necrosi tumoral α
UCPs: *Uncoupling proteins*
Uqcrc2: *Ubiquinone cytochrome c reductase subunit core 2* (complex III)

INTRODUCCIÓ

ELS MITOCONDRIIS

Els mitocondris són orgànuls citoplasmàtics presents a la majoria de cèl·lules eucariotes. Aquests orgànuls estan considerats “plantes d’energia cel·lular”, ja que produeixen la major part de l’ATP que necessiten les cèl·lules com a font d’energia. A més d’intervenir en l’oxidació de substrats i la producció d’ATP, els mitocondris tenen un paper fonamental en múltiples processos biològics, com la senyalització cel·lular, l’apoptosi, l’envelliment, el control del cicle cel·lular i l’homeòstasi del calci (Rutter i Rizzuto, 2000; Chomyn i Attardi, 2003; Kujoth *et al.*, 2005).

Els mitocondris estan formats per diferents compartiments amb funcions especialitzades: la membrana mitocondrial externa (MME), la membrana mitocondrial interna (MMI), l’espai intermembranós, les crestes mitocondrials i la matriu (Figura 1).

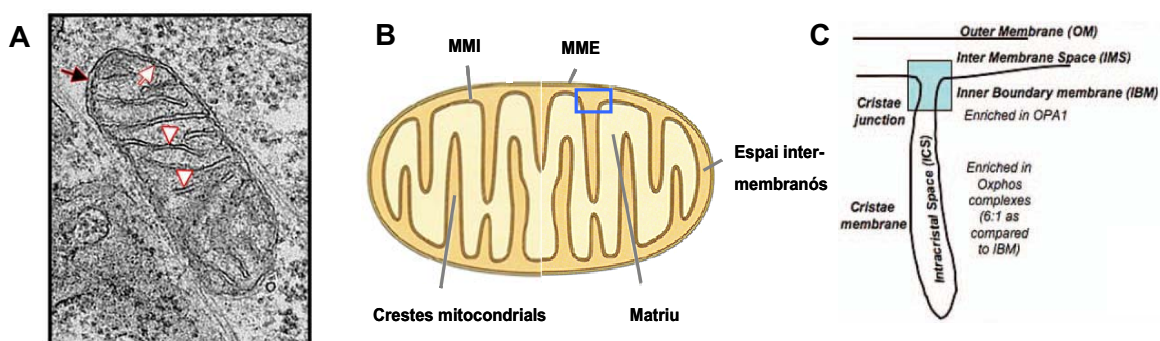


Figura 1. Ultraestructura dels mitocondris. (A) Visió clàssica d’un mitocondri obtinguda per microscopia electrònica (Benard i Karbowski, 2009). La fletxa negra assenyalava la membrana mitocondrial externa (MME), la fletxa blanca la membrana mitocondrial interna (MMI) i els triangles les crestes. (B) Esquema dels diferents compartiments mitocondrials; el rectangle assenyalava les unions de cresta. (C) Detall de les unions de cresta (Benard i Rossignol, 2008).

La MME és permeable a molècules petites (<5000Da) gràcies a la presència de porines, que formen porus a la membrana facilitant-ne el pas. En canvi, la MMI és impermeable a la majoria de molècules, que necessiten transportadors específics per entrar o sortir de la matriu mitocondrial. Invaginacions de la MMI formen les crestes mitocondrials, estructures que amplien la superfície de la membrana per augmentar la capacitat de produir ATP, ja que a la MMI hi trobem la cadena de transport electrònic. Els mitocondris presents en cèl·lules que tenen una major demanda d’ATP, com les musculars, contenen un nombre més gran de crestes mitocondrials. Les crestes estan connectades a la barrera interna de la MMI (IBM: *Inner boundary membrane*) per unes estructures tubulars estretes anomenades unions de cresta (*cristae junctions*) (Figura

1C). A la matriu mitocondrial hi tenen lloc diverses rutes metabòliques, com el cicle de Krebs i la beta-oxidació dels àcids grassos; també s'oxiden els aminoàcids i s'hi localitzen algunes reaccions de la síntesi d'urea i del grup hemo.

Els mitocondris tenen el seu propi material genètic, organitzat en forma de cromosoma circular i localitzat a la matriu mitocondrial. L'ADN mitocondrial (ADNmt) codifica 13 subunitats dels complexos de la cadena respiratòria, 2 ARN ribosòmics i els 22 ARN de transferència mitocondrials (Legros *et al.*, 2004). Cada mitocondri pot contenir entre 2 i 10 còpies d'ADNmt. La presència als mitocondris d'aquest ADN circular i de ribosomes 70s, característiques pròpies dels procariotes, així com la capacitat de dividir-se per fissió binària, recolzen la teoria de l'origen endosimbiòtic dels mitocondris (Margulis, 1975; Gray *et al.*, 1999).

A) BIOENERGÈTICA MITOCONDRIAL

A.1) LA CADENA DE TRANSPORT D'ELECTRONS I LA FOSFORILACIÓ OXIDATIVA

En els mitocondris té lloc l'oxidació de diferents substrats, com el piruvat procedent de la glucòlisi, àcids grassos o aminoàcids. Aquests substrats entren al mitocondri a través de transportadors específics, i un cop a la matriu mitocondrial, s'oxiden generant acetil-CoA que entra al cicle de Krebs o cicle de l'àcid tricarboxílic. L'acetil-CoA s'oxida fins a CO₂ i durant el procés, es produeixen els cofactors reduïts NADH i FADH₂.

La funció principal dels mitocondris és la producció d'energia en forma d'ATP, procés que rep el nom de fosforilació oxidativa (OXPHOS). En aquest procés, els electrons provinents de l'oxidació de NADH i FADH₂ passen a través d'una sèrie de complexos enzimàtics localitzats a la membrana mitocondrial interna, l'anomenada cadena respiratòria o cadena de transport d'electrons, i són transferits finalment a l'oxigen. El flux d'electrons per aquests complexos allibera energia que s'utilitza per bombejar protons a través de la MMI, des de la matriu cap a l'espai intermembranós. Això genera un gradient electroquímic de protons, que serà utilitzat per l'ATP sintasa per sintetitzar ATP a partir d'ADP i P_i. D'aquesta manera, el consum d'oxigen per part de la cadena respiratòria està acoblat a la síntesi d'ATP. L'ATP produït és exportat al citosol pel translocador de nucleòtids d'adenina (ANT), en un intercanvi amb ADP

citoplasmàtic (Benard i Rossignol, 2008). Els protons bombejats a l'espai intermembranós, però, poden tornar a entrar a la matriu mitocondrial per vies alternatives a l'ATP sintasa, procés que es coneix com a *proton leak* o pèrdua de protons (Brand, 1990). En aquest cas, l'activitat de la cadena respiratòria, i per tant el consum d'oxigen, no estan acoblats a la síntesi d'ATP i en diem respiració desacoblada. El *proton leak* es dona per difusió facilitada dels protons a través de la MMI o bé a través de les proteïnes desacoblants UCPs. Aquest procés dona lloc a un desaprofitament energètic del gradient electroquímic de protons (Brand *et al.*, 1994).

A.1.1) Components del sistema OXPHOS

El sistema OXPHOS inclou els complexos enzimàtics de la cadena respiratòria (complexes I-IV), l'ATP sintasa (també anomenada complex V) i dos transportadors mòbils d'electrons: la ubiquinona o coenzim Q i el citocrom c (Figura 2). Els complexos de la cadena respiratòria i l'ATP sintasa estan formats per múltiples subunitats, algunes d'elles codificades per gens nuclears i altres per gens mitocondrials. L'única excepció és el complex II, amb totes les subunitats codificades pel genoma nuclear. El pas d'electrons pels complexos I, III i IV està acoblat a la translocació de protons a través de la membrana mitocondrial interna (Saraste, 1999).

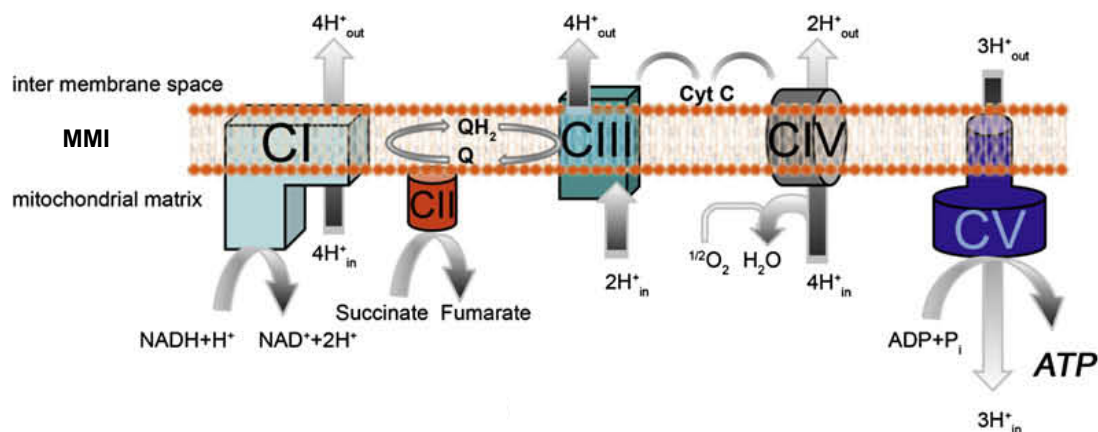


Figura 2. Esquema del sistema OXPHOS. El pas d'electrons a través dels complexos de la cadena respiratòria (CI, CII, CIII i CIV) genera un gradient electroquímic de protons que serà utilitzat per l'ATP sintasa (CV) per sintetitzar ATP. Q: ubiquinona, QH₂: ubiquinol, Cyt c: citocrom c (Acín-Pérez *et al.*, 2008).

El complex I o NADH deshidrogenasa és el principal punt d'entrada dels electrons a la cadena respiratòria. Catalitza la transferència d'electrons del NADH a la ubiquinona, reduint-la i generant ubiquinol, que pot difondre lliurement per la membrana. És el més

gran dels complexos, en mamífers consta de 45 subunitats diferents, 7 d'elles codificades pel genoma mitocondrial (Brandt, 1997). El complex II o Succinat deshidrogenasa està format per 4 subunitats i representa un punt d'entrada alternatiu d'electrons a la cadena respiratòria. Transfereix electrons del succinat a la ubiquinona, formant-se també ubiquinol. Connecta directament el cicle de Krebs amb la cadena de transport d'electrons. En aquest cas, la transferència d'electrons no està acoblada a la translocació de protons a través de la membrana (Hägerhäll, 1997). El component central del sistema OXPHOS, el complex III o Citocrom c reductasa és un homodímer amb 11 subunitats per monòmer. Transfereix els electrons des de l'ubiquinol al citocrom c, que és un transportador d'electrons hidrosoluble que es troba a l'espai intermembranós (Saraste, 1999). El complex IV o Citocrom c oxidasa és l'últim enzim de la cadena de transport electrònic. Està format per 13 subunitats, 3 de les quals estan codificades per gens mitocondrials (COX-I, COX-II i COX-III). Aquestes 3 subunitats són les que formen el centre actiu de l'enzim. Aquest complex capta els electrons del citocrom c i els transfereix a l'oxigen molecular per produir aigua. Al mateix temps es transloquen 4 H⁺ a través de la MMI, contribuint a la generació del gradient de protons (Tsukihara *et al.*, 1996). L'ATP sintasa o complex V està formada per 2 dominis: F₀ i F₁. F₀ actua com un canal iònic a través del qual els protons tornen a entrar a la matriu mitocondrial. Aquest flux de protons proporciona l'energia necessària per a la síntesi d'ATP a partir d'ADP i Pi, catalitzada per F₁. L'ATP sintasa és un enzim funcionalment reversible, ja que també pot hidrolitzar ATP (Lutter *et al.*, 1993).

A.1.2) Organització del sistema OXPHOS

Com ja hem comentat, els complexos de la cadena de transport electrònic i l'ATP sintasa es localitzen a la MMI, i són especialment abundants a les crestes mitocondrials (Gilkerson *et al.*, 2003). Durant dècades, l'organització del sistema OXPHOS dins de la membrana mitocondrial interna s'ha explicat amb un model anomenat "estat fluïd". Aquest model proposa que els complexos difonen lliurement per la membrana i que la transferència d'electrons té lloc quan es donen col·lisions arbitràries entre ells (Figura 3A). Es basa en el fet que tots els complexos s'han pogut purificar individualment en una forma enzimàticament activa (Hackenbrock *et al.*, 1986). Darrerament, però, han sorgit evidències que indiquen que els complexos de la cadena respiratòria es poden organitzar en estructures supramoleculares estables anomenades supercomplexes

(Schägger i Pfeiffer, 2000). Estan formats bàsicament pels complexes I, III i IV i presents en un ventall molt ampli d'organismes, des de llevats a plantes i a mamífers. Els supercomplexes descrits fins el moment són I+III₂, I+III₂+IV i III₂+IV, així com també una forma dimèrica de l'ATP sintasa. La presència d'aquests supercomplexes s'ha detectat mitjançant electroforesi en condicions natives (*Blue Native-PAGE*) (Schägger, 2001; Schägger i Pfeiffer, 2001) i també en estudis de *single particle electron microscopy* (Dudkina *et al.*, 2005, 2006). A més, amb assajos d'activitat en gel i de consum d'oxigen, s'ha comprovat que els supercomplexes són funcionals (Schägger *et al.*, 2000; Eubel *et al.*, 2004; Acín-Pérez *et al.*, 2008). Per altra banda, diversos treballs demostren que mutacions en gens que codifiquen subunitats d'un determinat complex del sistema OXPHOS poden afectar l'estabilitat d'un altre dels complexos (Acín-Pérez *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2006). Totes aquestes troballes recolzen el model "estat sòlid" (Figura 3B), en què es postula que l'organització en supercomplexes estables facilitaria un transport d'electrons més ràpid i eficient (Lenaz i Genova, 2007). La informació existent sobre l'estructura d'aquests supercomplexes es pot consultar en excel·lents revisions (Vonck i Schäfer, 2009; Wittig i Schägger, 2009; Lenaz i Genova, 2010).

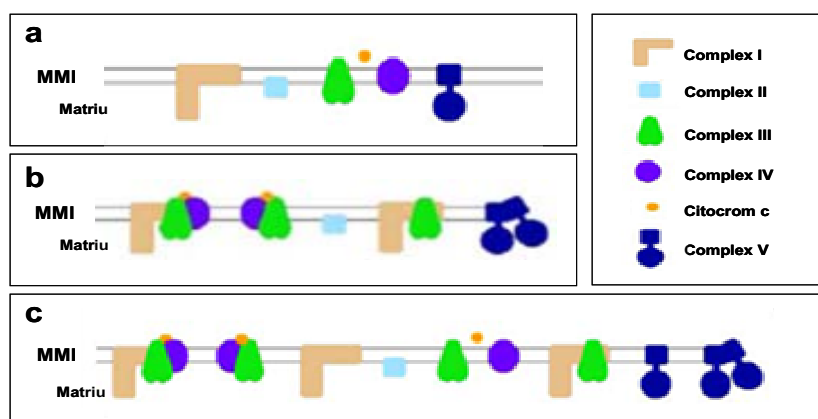


Figura 3. Representació esquemàtica dels models d'organització del sistema OXPHOS. a) Model "estat fluid". Els complexos difonen lliurement per la membrana mitocondrial interna (MMI). **b) Model "estat sòlid".** Els supercomplexes són estructures estables. S'observen els supercomplexes I+III₂, I+III₂+IV, III₂+IV i la forma dimèrica del complex V. **c) Model integrat.** Coexistència a la MMI de complexos i supercomplexos. Adaptat de Dudkina *et al.*, 2008.

Malgrat la presència demostrada dels supercomplexes, en anàlisis de *Blue Native-PAGE* també es detecten les formes monomèriques dels complexos, que són les formes majoritàries en el cas dels complexos II, IV i V. Aquest fet ha portat a la definició d'un nou model d'organització del sistema OXPHOS: el model "integrat o de plasticitat",

que defensa la coexistència en la MMI de complexos i supercomplexos (Figura 3C). Aquest model considera que l'associació dels complexos en supercomplexos i la seva dissociació és un procés dinàmic que depèn de l'estat fisiològic de la cèl·lula (Dudkina *et al.*, 2008; Acín-Pérez *et al.*, 2008).

A.1.3) Producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS)

La cadena respiratòria mitocondrial és la principal font de ROS, especialment de l'anió superòxid, de peròxid d'hidrogen i de radical hidroxil (St-Pierre *et al.*, 2002). Aquestes molècules són producte del metabolisme energètic mitocondrial i intervien en la senyalització cel·lular. No obstant, elevades concentracions de ROS són perjudicials per les cèl·lules i contribueixen al desenvolupament de diversos processos patològics i a l'envelliment (Addabbo *et al.*, 2009). La generació de superòxid té lloc per la pèrdua d'electrons en els complexos I, II i III, que redueixen parcialment l'oxigen molecular. La major part del superòxid és convertit ràpidament en peròxid d'hidrogen per acció de l'enzim superòxid dismutasa.

Els nivells de producció de ROS depenen de l'estat energètic mitocondrial i augmenten quan el potencial de membrana mitocondrial és elevat (Korshunov *et al.*, 1997). La producció de ROS s'incrementa en inhibir-se els complexos de la cadena de transport electrònic, com s'observa en determinades malalties d'origen mitocondrial o en models animals amb deficiències en el sistema OXPHOS (Melov *et al.*, 1998). L'acumulació de ROS causa estrès oxidatiu en danyar tots els components cel·lulars: proteïnes, lípids i ADN. En aquest sentit l'ADN mitocondrial és particularment susceptible a ser oxidat per ROS, degut a la seva proximitat a la cadena respiratòria. Mutacions a l'ADNmt provoquen una disfunció de la cadena de transport d'electrons, i per tant, una major producció de ROS. Nivells excessius de ROS poden conduir a l'apoptosi o mort cel·lular programada (Kroemer, 2003).

B) DINÀMICA MITOCONDRIAL

L'heterogeneïtat de la morfologia mitocondrial és coneguda des de les primeres descripcions d'aquest òrganul a mitjans del segle XIX. A finals del mateix segle van rebre el nom de *mitochondrion*, provinent dels mots grecs *mitos* i *chondros*, que signifiquen fil i gra respectivament (Benda, 1898). Durant dècades, els mitocondris han

estat considerats orgànuls independents i aïllats. No obstant, a principis del segle XX, i gràcies als avenços en la microscopia de camp clar i en els cultius cel·lulars, es va demostrar que els mitocondris podien presentar diferents morfologies, degudes probablement a la seva naturalesa dinàmica (Lewis i Lewis, 1914).

En les dècades dels 40 i 50 es va descobrir que la β -oxidació dels àcids grassos, el cicle de Krebs i la fosforilació oxidativa tenien lloc dins els mitocondris (Lehninger, 1965). Aquestes troballes, juntament amb la publicació d'imatges de microscopia electrònica d'alta resolució d'aquests orgànuls, van afavorir el concepte de la funció independent i autònoma dels mitocondris. A finals dels 60 però, diferents estudis van demostrar la complementació i recombinació de l'ADN mitocondrial en llevat, degudes a probables fenòmens de fusió entre mitocondris d'aquest organisme (Thomas i Wilkie, 1968; Stevens, 1977). Posteriorment, hi hagué noves descripcions de processos de fusió mitocondrial i de formació de xarxes mitocondrials també en cèl·lules de mamífer (Wakabayashi *et al.*, 1977; Bakeeva *et al.*, 1978).

Als anys 90, el desenvolupament de sondes i proteïnes fluorescents dirigides a la matriu mitocondrial van permetre visualitzar fenòmens de fusió mitocondrial en diversos models cel·lulars, des de llevats fins a hepatòcits (Nunnari *et al.*, 1997; Cortese *et al.*, 1998) i comprovar que els mitocondris formen estructures dinàmiques. Aquest dinamisme es refereix tant al moviment dels mitocondris al llarg del citoesquelet com també als canvis en la morfologia mitocondrial controlats per processos de fusió i fissió.

La primera proteïna implicada en fusió mitocondrial descoberta va ser Fzo (*Fuzzy onions protein*) de *Drosophila melanogaster* (Hales i Fuller, 1997). En la darrera dècada, diversos gens que modulen la fusió i la fissió mitocondrial han estat identificats, primer en llevats i posteriorment en cèl·lules de mamífer (Yaffe, 1999).

B.1) FUSIÓ MITOCONDRIAL I PROTEÏNES IMPLICADES

La fusió mitocondrial és un procés complex que implica la fusió coordinada de dues membranes lipídiques, la membrana mitocondrial externa i la membrana mitocondrial interna. És un fenomen estructurat en dos passos, en què primer es fusionen les membranes externes de dos mitocondris adjacents i posteriorment ho fan les membranes internes (Malka *et al.*, 2005). La fusió dels mitocondris depèn del potencial de membrana mitocondrial i de la hidròlisi de GTP (Legros *et al.*, 2002; Meeusen *et al.*, 2004).

En mamífers, les proteïnes descrites fins el moment que participen directament en la fusió mitocondrial són Mfn1, Mfn2 (mitofusines 1 i 2, respectivament) i OPA1 (*Optic Atrophy gene 1*). Totes elles són proteïnes relacionades amb la dinamina i presenten activitat GTPasa. Les dues mitofusines es localitzen a la membrana mitocondrial externa mentre que OPA1 es troba a la membrana mitocondrial interna i a l'espai intermembrana (Figura 4). Les tres proteïnes s'han detectat en un mateix complex, suggerint la coregulació dels dos passos del procés de fusió (Guillery *et al.*, 2008). La disminució de l'activitat d'aquestes proteïnes, ja sigui per repressió, ablació o mutacions que generin pèrdua de funció, produeix fragmentació mitocondrial o un escurçament dels filaments mitocondrials (Bach *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Griparic *et al.*, 2004). Per contra, la reintroducció de proteïnes de fusió en models on prèviament hi són absents induïx la formació de filaments (Santel i Fuller, 2001; Cipolat *et al.*, 2004). A més, el guany de funció de qualsevol d'aquestes proteïnes sumat a la inhibició de la fissió mitocondrial produeix l'aparició de llargs filaments mitocondrials (Santel i Fuller, 2001).

Mfn1 i Mfn2 són els homòlegs en mamífer de la proteïna Fzo. Les mitofusines localitzades en mitocondris adjacents poden formar dímers (homodímers o heterodímers) que són essencials perquè tingui lloc la fusió (Koshiba *et al.*, 2004). Ha estat descrit que per a la fusió mitocondrial mediada per Mfn1 i Mfn2 es requereix l'activitat de la fosfolipasa D mitocondrial (mitoPLD), que hidrolitza la cardiolipina. No obstant, encara no es coneix com aquesta hidròlisi regula el procés de fusió mitocondrial (Huang *et al.*, 2009). L'expressió de Mfn1 i Mfn2 és ubiqua tot i que els nivells d'expressió difereixen segons el teixit: Mfn1 predomina en fetge, pàncrees, glàndules adrenals i testicles mentre que Mfn2 és més abundant en cor, múscul esquelètic, cervell i teixit adipós marró (Eura *et al.*, 2003; Bach *et al.*, 2003). En ser l'objecte d'estudi d'aquesta tesi, es parlarà detalladament de Mfn2 a l'apartat C de la Introducció.

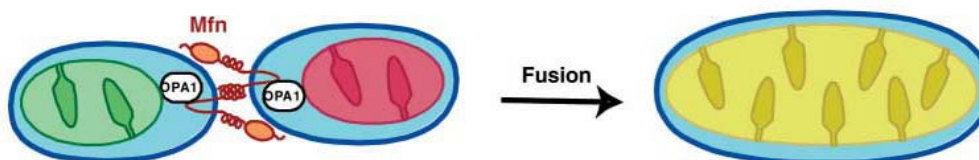


Figura 4. Maquinària de fusió mitocondrial. En el procés de fusió mitocondrial en mamífers hi participen les proteïnes Mfn1 i Mfn2, localitzades a la membrana mitocondrial externa, i OPA1, situada a la membrana mitocondrial interna. El primer pas de la fusió és la interacció entre els extrems C-terminal de Mfn, de mitocondris adjacents. La fusió completa, representada per la mescla de les matrius mitocondrials verda i vermella per donar lloc a la groga, requereix l'acció coordinada de les mitofusines i d'OPA1 (Chen i Chan, 2005).

OPA1 és l'ortòleg en mamífers de *Mgm1*, proteïna descrita prèviament en *Saccharomyces cerevisiae* (Wong *et al.*, 2000), i està implicada en la fusió de la membrana mitocondrial interna i en el control de la morfologia de les crestes mitocondrials (Cipolat *et al.*, 2004). OPA1 s'expressa en tots els teixits, mostrant una elevada expressió en retina, cervell, testicles, fetge, cor i múscul esquelètic. OPA1 presenta una regulació post-transcripcional i post-traduccional molt complexa, mostrant diferents llocs de proteòlisi i formes de *splicing* (Ishihara *et al.*, 2006). Aquestes isoformes tenen diferent activitat de fusió. S'han identificat diverses proteïnes que proteolitzen OPA1: les metal·loproteases m-AAA, la proteïna Yme1L (i-AAA proteasa), la proteïna PARL (*Preselenin-Associated Rhomboid-Like protease*) i la proteïna OMA1 (Cipolat *et al.*, 2006; Duvezin-Caubet *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007; Ehses *et al.*, 2009).

B.2) FISSIÓ MITOCONDRIAL I PROTEÏNES IMPLICADES

Les principals proteïnes identificades fins ara implicades directament en la fissió mitocondrial en mamífers són Drp1 (*Dynammin-related protein 1*) i Fis1 (*Fission 1 homologue protein*) (Figura 5). Drp1 és una GTPasa soluble localitzada al citosol i que s'expressa a tots els teixits analitzats (Smirnova *et al.*, 1998). Estudis recents mostren que Drp1 també té un paper rellevant en altres processos com la funció neuronal, la diferenciació muscular i cardíaca i el cicle cel·lular (Wang *et al.*, 2008). La seva activitat en la fissió es troba regulada per modificacions posttraduccional (Santel i Frank 2008).

La fissió mitocondrial requereix la translocació de Drp1 a la membrana mitocondrial externa, on forma unes estructures puntejades localitzades als futurs llocs d'escissió (Smirnova *et al.*, 2001). Per què es produeixi aquesta translocació Drp1 ha d'interaccionar amb una proteïna ancorada a la membrana mitocondrial externa, Fis1 (Yoon *et al.*, 2003). Fis1 és una proteïna petita, d'expressió ubiqua i que, al contrari que la resta de proteïnes de fusió i fissió, no presenta activitat GTPasa. La inhibició de l'expressió de Drp1 amb ARNi (Smirnova *et al.* 2001; Lee *et al.* 2004) o la sobreexpressió d'una forma dominant negativa (Frank *et al.* 2001) dóna lloc a l'aparició de filaments mitocondrials molt llargs i interconnectats. La disminució en l'expressió de Fis1 també causa elongació dels mitocondris (Lee *et al.* 2004). Fis1 i Drp1 també controlen la fissió dels peroxisomes (Koch *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2005).

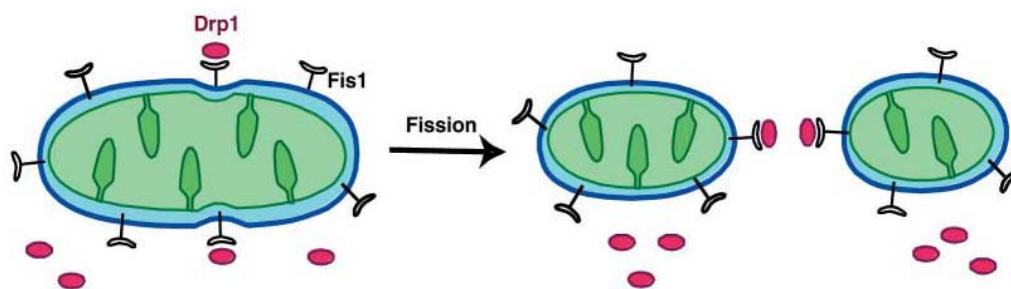


Figura 5. Maquinària de fissió mitocondrial. En el procés de fissió mitocondrial, Drp1 es transloca als mitocondris mitjançant la interacció amb la proteïna de la membrana mitocondrial externa Fis1. Aquests punts d'interacció seran els futurs llocs de constricció i escissió (Chen i Chan, 2005).

A part de les mencionades anteriorment, s'han descrit altres proteïnes implicades en el procés de fissió mitocondrial, tot i que se'n desconeixen els mecanismes d'acció. Aquestes proteïnes són l'endofilina B, la MTP18, la GDAP1 o *Ganglioside-induced Differentiation Activated Protein 1*, la ubiquitina lligasa MULAN i la Mff o *Mitochondrial fission factor* (Karbowski *et al.*, 2004; Tondera *et al.*, 2005; Pedrola *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Otera *et al.*, 2010).

B.3) RELACIÓ ENTRE LA DINÀMICA I LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL

L'equilibri entre els processos de fusió i fissió és crucial pel manteniment de la correcta funció dels mitocondris. Diversos estudis demostren que la dinàmica mitocondrial juga un paper clau regulant processos fisiològics com el desenvolupament, la fosforilació oxidativa, el consum d'oxigen, el cicle cel·lular, l'apoptosi i l'autofàgia.

La fusió mitocondrial és essencial en el desenvolupament dels mamífers. Els ratolins *knockout* (KO) de Mfn1 o de Mfn2 moren durant la gestació a causa de defectes a la placenta (Chen *et al.*, 2003), i 2 models de ratolins amb mutacions a OPA1 també presenten letalitat embrionària (Alavi *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2007).

El grup de Skulachev fou el primer en posar de manifest l'estreta relació entre dinàmica mitocondrial i metabolisme energètic. En estudis realitzats prèviament a la identificació de les proteïnes de fusió i fissió mitocondrial, Skulachev i col·laboradors demostraren que els filaments mitocondrials actuaven com a conductors del potencial de membrana mitocondrial en fibroblasts i cardiomiòcits (Amchenkova *et al.*, 1988; Skulachev, 2001). Sobre la base d'aquestes observacions, es proposà que l'activitat

elèctrica de la xarxa mitocondrial en cèl·lules com les fibres musculars permetia la transmissió d'energia des de la perifèria al centre de les cèl·lules.

Existeixen evidències del paper de les mitofusines en el manteniment del metabolisme mitocondrial. Fibroblasts deficients en Mfn1 o Mfn2 presenten una capacitat respiratòria reduïda i una gran heterogeneïtat pel que fa a la morfologia i al potencial de membrana mitocondrial (Chen *et al.*, 2005). Alteracions en l'expressió d'OPA1 també afecten el metabolisme mitocondrial. Així, la repressió d'OPA1 en cèl·lules HeLa causa una marcada reducció en el potencial de membrana mitocondrial (Olichon *et al.*, 2003). Cèl·lules MEF deficients en OPA1 mostren una disminució de la respiració basal i una incapacitat d'incrementar el consum d'oxigen en presència del desacoblant 2,4-dinitrofenol (Chen *et al.*, 2005). Fibroblasts derivats de pacients amb determinades mutacions a OPA1 presenten alteracions en la síntesi d'ATP (Zanna *et al.*, 2008).

Estudis recents demostren que alteracions en les proteïnes de fissió mitocondrial produeixen efectes similars en el metabolisme mitocondrial. La repressió de Drp1 en cèl·lules HeLa causa una disminució en la taxa de consum d'oxigen basal i una menor taxa de síntesi d'ATP (Benard *et al.*, 2007). La repressió de l'expressió de Fis1 també redueix la capacitat respiratòria de cèl·lules INS1 (Twig *et al.*, 2008). Amb tot, es pot concloure que la pertorbació de la dinàmica mitocondrial, tant a través de les proteïnes de fusió com de les de fissió, altera la producció d'energia per part dels mitocondris en cèl·lules de mamífer.

La dinàmica mitocondrial té un important paper en la regulació de l'apoptosi (Scorrano, 2009). La inhibició de l'activitat de fissió lligada a Drp1 disminueix la fragmentació mitocondrial, redueix la sortida de citocrom c i retarda la resposta apoptòtica. A més, després d'un estímul apoptòtic, Drp1 colocalitza amb Mfn2 i amb la proteïna pro-apoptòtica Bax en punts concrets dels mitocondris (Karbowski *et al.*, 2006). Per altra banda, la sobreexpressió de Fis1 indueix fragmentació mitocondrial i estimula l'apoptosi (Lee *et al.* 2004). També s'ha comprovat que les proteïnes proapoptòtiques Bax i Bak controlen la morfologia mitocondrial, ja que cèl·lules que en són deficients presenten una notable fragmentació mitocondrial deguda a una reduïda activitat de fusió (Karbowski *et al.*, 2006). Diversos estudis han demostrat que la proteïna de fusió OPA1 també participa en la mort cel·lular programada, ja que la seva repressió activa l'apoptosi incrementant l'alliberament del citocrom c (Arnoult *et al.*,

2005). Aquest fet indica la importància del manteniment de la morfologia de les crestes mitocondrials (Olichon *et al.*, 2003).

Recentment, s'ha descrit la interacció funcional entre dinàmica mitocondrial i autofàgia. La maquinària de fissió mitocondrial és necessària per descartar els mitocondris danyats de la xarxa, que seran eliminats per autofàgia (Twig *et al.*, 2008). La repressió de Fis1 o la sobreexpressió d'una forma dominant negativa de Drp1 disminueixen la mitofàgia, causant l'acumulació de mitocondris danyats, i a la llarga, disfunció mitocondrial. OPA1 també és un factor clau en aquest procés (Twig *et al.*, 2008). Per altra banda, Fis1 està implicada també en la regulació de la senescència, procés relacionat amb l'autofàgia. Les cèl·lules senescentes presenten una incrementada longitud mitocondrial, explicada per la reducció de l'expressió de Fis1 i un lleuger increment en l'expressió de Mfn1 i Mfn2 (Lee *et al.*, 2007).

A part del mencionat anteriorment, s'ha de tenir en compte que tant la funció com la dinàmica mitocondrial es troben alterades en diverses malalties neurodegeneratives, com el Parkinson, l'Alzheimer, o la malaltia de Huntington (Chen *et al.*, 2009). A més, mutacions en gens que codifiquen proteïnes involucrades en dinàmica mitocondrial causen diverses patologies. Per exemple, les neuropaties Charcot-Marie-Tooth de tipus 2A i l'atròfia òptica autosòmica dominant estan causades per mutacions als gens de fusió mitocondrial Mfn2 i OPA1 respectivament (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000; Zuchner *et al.*, 2004). També s'ha descrit una mutació en la proteïna de fissió mitocondrial Drp1 que provoca un síndrome letal caracteritzat per atròfia òptica i acumulació d'àcid làctic a la sang (Waterham *et al.*, 2007).

C) MITOFUSINA 2 (Mfn2)

Mitofusina 2 va ser identificada inicialment per homologia amb la proteïna Fzo de *Drosophila melanogaster* (Rojo *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Eura *et al.*, 2003). Pràcticament al mateix temps, també fou descrita per dos grups de recerca que buscaven gens que s'expressessin diferencialment en diverses condicions patològiques. El primer d'aquests anàlisis va ser realitzat al nostre laboratori pel Dr. Daniel Bach, que identificà un gen amb l'expressió disminuïda en múscul esquelètic de rates genèticament obeses. Aquest gen s'anomenà originàriament *Mitochondrial Assembly Regulatory Factor* o MARF (Bach *et al.*, 2003). El segon anàlisi s'efectuà en cèl·lules de la musculatura

llisa vascular (VSMC) de rates hipertenses, on s'identificà aquest mateix gen reprimit i se l'anomenà *Hyperplasia Suppressor Gene* o HSG (Chen *et al.*, 2004).

C.1) DOMINIS I ACTIVITAT DE MITOFUSINA 2 HUMANA

La Mfn2 humana (hMfn2) és una proteïna de 757 aminoàcids, localitzada a la membrana mitocondrial externa i amb els extrems N i C-terminal exposats al citosol (Figura 6). La proteïna Mfn2, tal com succeeix amb Mfn1, presenta una distribució “dispersa” al llarg de la xarxa mitocondrial (Santel i Fuller, 2001; Rojo *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Tot i així, també s'ha detectat en regions específiques o *tips* (*mitochondrial scission sites*). Aquesta distribució més localitzada és important pels canvis en la morfologia mitocondrial observats durant l'apoptosi (Karbowski *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2007).

L'extrem N-terminal de la proteïna conté un domini GTPasa (103-309 aa), un domini *coiled-coil* (CC1, 367-422 aa) i un domini d'unió a p21ras (77-92 aa) (Koshiba *et al.*, 2004). El domini GTPasa està format per 5 caixes o motius anomenats G1-G5 (Figura 6). Els motius G1, G2 i G3 estan implicats en la interacció amb els tres fosfats de la molècula de GTP i formen el centre catalític, mentre que els motius G4 i G5 confereixen l'especificitat d'unió al GTP i no permeten la unió de molècules d'ATP (Bourne *et al.*, 1991).

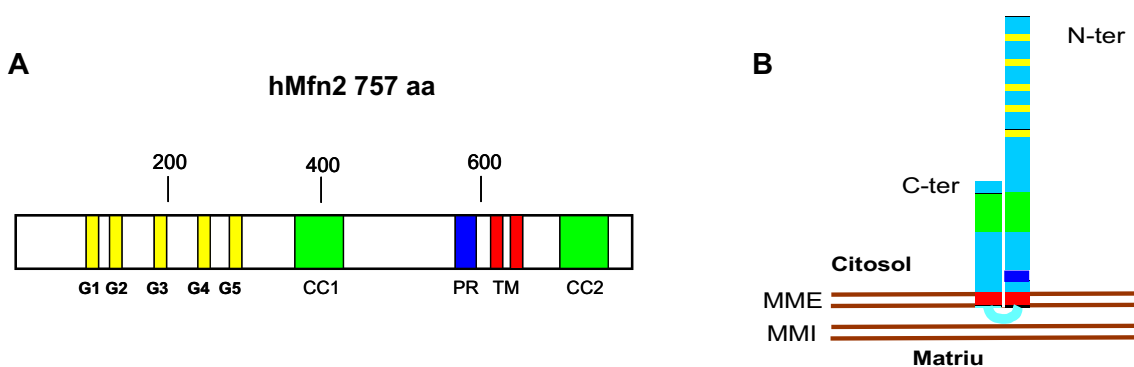


Figura 6. Representació esquemàtica dels dominis i de la topologia de Mfn2. (A) En groc es mostren els 5 motius (G1-G5) del domini GTPasa i en verd els dos dominis *coiled-coil* (CC1 i CC2). Els CC són dominis d'interacció proteïna-proteïna. En blau s'assenyala el domini ric en prolines (PR) i en vermell els 2 segments transmembrana (TM). (B) Mfn2 es troba ancorada a la membrana mitocondrial externa (MME) a través dels segments transmembrana, amb els extrems N-terminal i C-terminal exposats al citosol. El petit *loop* que uneix els dos segments transmembrana queda orientat a l'espai intermembranós.

L'activitat GTPasa és indispensable per la fusió mitocondrial. Mutacions en aquest domini que inhibeixin l'hidròlisi de GTP, com la mutació K109T, impedeixen l'elongació dels filaments mitocondrials (Chen *et al.*, 2003; Eura *et al.*, 2003). En canvi,

mutacions que incrementen l'afinitat pel GTP activen la fusió mitocondrial (Rojo *et al.*, 2002). Mfn2 presenta una afinitat pel GTP més elevada que Mfn1 però en canvi presenta una activitat GTPasa més baixa (Ishihara *et al.*, 2004; Neuspiel *et al.*, 2005). Aquestes diferències es tradueixen en una major activitat de fusió mitocondrial per part de Mfn1 (Chen *et al.*, 2003; Santel *et al.*, 2003).

La regió C-terminal de la proteïna, que conté el domini transmembrana (residus 615-648 aa) i un altre domini *coiled-coil* (CC2, residus 693-747 aa), és la responsable de la seva localització mitocondrial (Figura 6) (Santel i Fuller, 2001; Rojo *et al.*, 2002). El domini transmembrana està format per dos segments hidrofòbics units per un petit *loop* (627-632 aa) orientat a l'espai intermembranós. Una mutació en aquest *loop* (W631P) inhibeix la fusió mitocondrial (Neuspiel *et al.*, 2005). Es postula que la mutació W631P impediria la formació del complex Mfn1/Mfn2/OPA1, detectat per immunoprecipitació, que es genera durant el procés de fusió (Guillery *et al.*, 2008). El domini CC2 està implicat en el primer pas de la fusió mitocondrial, que és la interacció entre dues mitofusines de mitocondris adjacents (Koshiba *et al.*, 2004). Mfn2 també presenta un domini ric en prolines (PR), entre les posicions 576 i 590, implicat en la interacció proteïna-proteïna (Figura 6) (Kay *et al.*, 2000).

Com hem dit anteriorment, Mfn2 pot formar dímers o heterodímers amb Mfn1 o Mfn2 localitzades en mitocondris adjacents. Experiments d'immunolocalització i immunoprecipitació de formes delecionades de Mfn2 mostren que els extrems N-terminal i C-terminal de la proteïna interaccionen. Aquest resultat suggereix també la formació d'oligòmers *cis* en un mateix mitocondri, tot i que actualment se'n desconeix la funció. Es postula que aquests complexos *cis* es formen a través de la interacció entre els dominis CC1 i CC2 (Rojo *et al.*, 2002; Honda *et al.*, 2005).

C.2) REGULACIÓ DE MITOFUSINA 2. PARTNERS I MODULADORS DE LA SEVA ACTIVITAT

Hi ha evidències de l'existència de regulació post-transcripcional i post-traducciona de Mfn2. En el nostre laboratori, la Dra. Déborah Naón ha identificat i descrit diferents variants de *splicing* de Mfn2. Dues d'aquestes variants es localitzen al reticle endoplasmàtic (RE), mentre que la tercera presenta una localització més ubiqüa, trobant-se als mitocondris, al RE i al nucli (Naón, 2009). Aquestes variants alternatives tenen activitat antiproliferativa i proapoptòtica però en canvi la seva expressió no té cap efecte

sobre la morfologia de la xarxa mitocondrial. Un altre estudi indica que Mfn2 està regulada pel proteasoma, ja que la inhibició d'aquest sistema augmenta la seva expressió (Karbowski *et al.*, 2006). Així, Mfn2 podria ser ubiquitinitzada, tal com s'ha descrit per l'ortòleg en llevats Fzo1 (Escobar-Henriques *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2008).

Tal com hem esmentat anteriorment, Mfn2 pot interaccionar amb ella mateixa i amb les proteïnes de fusió mitocondrial Mfn1 i OPA1. A part, s'han identificat diverses proteïnes que també interaccionen amb Mfn2: el proto-oncogen p21 Ras, la E3-ubiquitina-lligasa mitocondrial MARCH-V (*mitochondrial ubiquitin-ligase Membrane-Associated Ring CH*), la proteïna Stoml2 (*stomatolike protein 2*, descrita prèviament com a component del citoesquelet dels eritròcits) i les proteïnes relacionades amb l'apoptosi Bak, Bcl-X, Bcl-2 i l'homòleg de Bcl en *Caenorhabditis elegans* CED-9 (Chen *et al.*, 2004; Delivani *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2006; Hajek *et al.*, 2007). Assajos d'immunoprecipitació han demostrat que l'única d'aquestes proteïnes que també interacciona amb Mfn1 és Bak (Brooks *et al.*, 2007). La sobreexpressió de MARCH-V dóna lloc a la formació de llargs filaments mitocondrials. Aquesta proteïna interacciona amb Mfn2 però no l'ubiquitinitza; en canvi, sí que ubiquitinitza i controla els nivells proteics de Drp1. Així, MARCH-V presenta un paper regulador tant de la fusió com de la fissió mitocondrial, però a través de diferents mecanismes (Nakamura *et al.*, 2006).

C.3) PAPER FISIOLÒGIC DE MFN2

Mfn2 és rellevant en múltiples funcions cel·lulars com el metabolisme oxidatiu, el cicle cel·lular, la mort cel·lular i el transport dels mitocondris al llarg dels axons. Aquests papers funcionals addicionals, que poden ser dependents o no de la seva activitat de fusió mitocondrial, podrien explicar el diferent perfil d'expressió tissular respecte Mfn1 o la seva implicació en diferents patologies (Bach *et al.*, 2003; Santel *et al.*, 2003).

La importància fisiològica de Mfn2 va quedar ben palesa amb l'estudi del model de ratolí Mfn2 KO. L'expressió de Mfn2 és essencial pel desenvolupament dels embrions ja que la pèrdua de funció causa un defecte letal a la placenta (Chen *et al.* 2003; Chen *et al.* 2007). Els fibroblasts derivats d'embrions mostraren una reducció en l'activitat de

fusió mitocondrial, malgrat que presentaren un fenotip de fragmentació mitocondrial menys marcat que en el cas dels fibroblasts deficients en Mfn1 (Chen *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005). Per evitar la letalitat embrionària, Chen i col·laboradors van generar un model *knockout* condicional en què Mfn1 o Mfn2 només s'expressaven en les cèl·lules de la placenta (Chen *et al.* 2007). Mentre que els ratolins *knockout* condicionals de Mfn1 són viables i fèrtils almenys durant 1 any, els ratolins deficients en Mfn2 mostren defectes en el moviment, un desenvolupament del cerebel alterat i moren abans de les 3 setmanes d'edat.

C.3.1) Implicació de Mfn2 en la proliferació cel·lular i en l'apoptosi

Existeixen diverses evidències del paper regulador de Mfn2 sobre el cicle cel·lular. L'expressió de Mfn2 es troba disminuïda en les cèl·lules de la musculatura llisa vascular (VSMC) en situacions d'hiperproliferació cel·lular, com l'aterosclerosi o la restenosi (Chen *et al.*, 2004). En canvi, la sobreexpressió de Mfn2 en VSMC provoca l'aturada del cicle cel·lular, amb un augment del nombre de cèl·lules en les fases G0/G1 i una reducció de les cèl·lules en les fases S i G2/M (Chen *et al.*, 2004). En estudis realitzats *in vivo*, la sobreexpressió de Mfn2 evita la restenosi associada a l'angioplàstia en rates, i redueix la formació de lesions ateroscleròtiques en conills alimentats amb una dieta rica en colesterol (Guo *et al.*, 2007). Aquests treballs tenen rellevants implicacions clíniques ja que la proliferació de les VSMC és crítica en determinades malalties cardiovasculars (Dzau *et al.*, 2002). El mecanisme proposat a través del qual Mfn2 provoca l'aturada del cicle cel·lular implica la unió amb la proteïna Ras. Aquesta interacció genera la subseqüent inhibició de la via de senyalització Ras-Raf-MEK-ERK1/2. La deleció del motiu p21ras de Mfn2 aboleix els efectes de Mfn2 en la inhibició d'ERK1/2 i del creixement cel·lular (Chen *et al.*, 2004).

Ha estat demostrat que Mfn2 interacciona tant amb proteïnes proapoptòtiques com Bak, com amb les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-X (Delivani *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2007). Bak i Bax controlen la morfologia mitocondrial a través de Mfn2, ja que Bax inhibeix l'activitat de fusió de Mfn2 durant l'apoptosi (Karbowski *et al.*, 2002; Karbowski *et al.*, 2006). Per altra banda, la proteïna antiapoptòtica Bcl-X indueix fusió mitocondrial, que protegeix contra l'apoptosi en determinats models (Lee *et al.*, 2004). A més, existeix un treball que indica que l'expressió d'una forma

constitutivament activa de Mfn2, que incrementa la fusió mitocondrial, prevé la translocació de Bax als mitocondris (Neuspiel *et al.*, 2005). Aquestes dades suggeririen que el manteniment de la capacitat de fusió mitocondrial és rellevant com a mecanisme antiapoptòtic. Recentment però, s'han publicat diferents estudis que anirien en sentit oposat als mencionats, ja que indiquen que la sobreexpressió de Mfn2 induïx apoptosi en cèl·lules tumorals (Wu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

C.3.2) Paper de Mfn2 en la interacció mitocondris-reticle endoplasmàtic

Recentment s'ha descrit la localització de Mfn2 al reticle endoplasmàtic (RE), on s'hi localitza aproximadament un 7% de la proteïna (de Brito i Scorrano, 2008). La funció del RE està íntimament relacionada amb la funció mitocondrial. Els dos orgànuls formen una xarxa interconnectada i dinàmica a través de la qual cooperen per generar senyals de Ca^{2+} (Pinton *et al.*, 2008; Giorgi *et al.*, 2009). Les regions de contacte entre la membrana mitocondrial externa i el RE reben el nom de MAMs (*Mitochondria-Associated Membranes*) i són zones d'intercanvi de fosfolípids entre els dos orgànuls (Vance, 1990; Stone i Vance, 2000). Aquestes regions també són importants pel flux de Ca^{2+} entre el RE i els mitocondris. És precisament en les MAMs on trobem una gran expressió de Mfn2 (de Brito i Scorrano, 2008). D'aquesta manera, la interacció entre el RE i els mitocondris tindria lloc a través de la interacció entre les mitofusines presents als dos orgànuls. Aquest treball també demostra que Mfn2 regula la morfologia del RE així com la concentració de calci en aquest orgànel i en el citosol. Aquestes troballes suggereixen que Mfn2 juga un paper important en la senyalització del calci.

C.3.3) Paper de Mfn2 en el metabolisme mitocondrial

En els darrers anys diferents estudis han demostrat l'impacte de l'alteració d'algunes proteïnes de dinàmica mitocondrial sobre el metabolisme energètic i la funció mitocondrial (Chen *et al.*, 2005; Benard *et al.*, 2007; Twig *et al.*, 2008). En el nostre laboratori s'ha investigat el paper de Mfn2 en la regulació del metabolisme mitocondrial en diferents models cel·lulars. Així, es va observar que fibroblasts 10T1/2 transfectats de manera estable amb una seqüència antisentit de Mfn2 presenten una disminució en l'oxidació de glucosa (Bach *et al.*, 2003). A més, en models cel·lulars musculars com els miotubs L6E9 de rata, la repressió de Mfn2 també provocà una reducció de

l'oxidació de glucosa, així com una caiguda en el potencial de membrana mitocondrial (Figura 7) (Bach *et al.*, 2003; Pich *et al.*, 2005). En aquestes condicions, la captació de glucosa i la producció de lactat es troben incrementades en les cèl·lules L6E9 amb menor expressió de Mfn2, mentre que la incorporació de glucosa a glicogen es troba lleugerament disminuïda. La repressió de Mfn2 en cèl·lules musculars L6E9 també provoca una menor taxa d'oxidació de palmitat i de piruvat (Pich *et al.*, 2005).

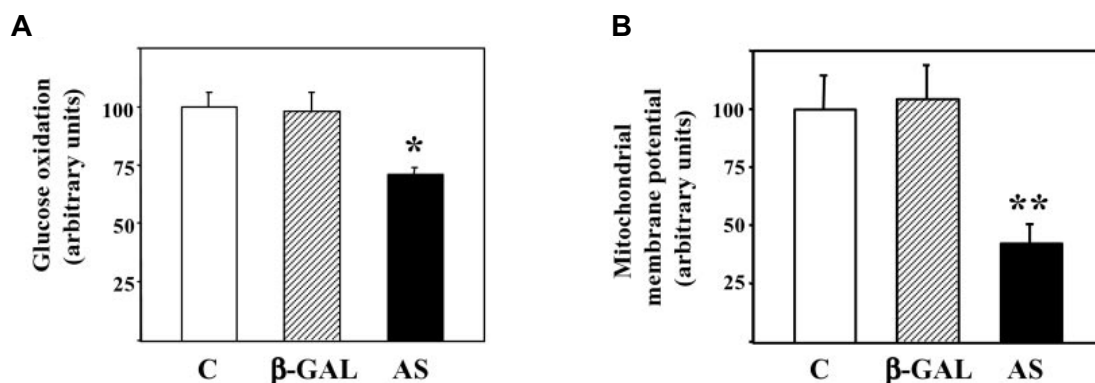


Figura 7. Efectes de la repressió de Mfn2 en miotubs L6E9. (A) Mesura de l'oxidació de glucosa en miotubs no transduïts (C) i miotubs transduïts amb adenovirus que codifiquen la β -galactosidasa (β -GAL) o la seqüència antisentit de Mfn2 (AS). * indica diferències estadísticament significatives amb una $p < 0,05$. (B) Determinació del potencial de membrana mitocondrial amb la sonda JC-1. ** indica diferències estadísticament significatives entre miotubs β -GAL i AS amb una $p < 0,001$ (Bach *et al.*, 2003).

L'alteració observada en l'oxidació de diferents substrats no s'explica per una disminució en la massa mitocondrial, ja que en aquestes condicions no s'observen canvis ni en el marcatge amb la sonda NAO (*Nonyl Acridine Orange*), ni en l'abundància de la proteïna mitocondrial porina (Pich, 2004). Aquests resultats van en consonància amb les observacions realitzades en cèl·lules MEF amb mutacions a ambdues mitofusines (Mfn1 i Mfn2). Aquestes cèl·lules mostren disminució en el potencial de membrana mitocondrial, respiració basal reduïda i una incapacitat per incrementar el consum d'oxigen després de l'addició del ionòfor 2,4-dinitrofenol. La respiració es normalitza en sobreexpressar Mfn2 (Chen *et al.* 2005).

La repressió de Mfn2 en miotubs L6E9 causa una marcada disminució en l'expressió d'algunes subunitats dels complexos I, II, III i V de la cadena de transport electrònic. En paral·lel, l'activitat enzimàtica dels complexos I+III i III disminueix en les cèl·lules amb menor expressió de Mfn2 (Pich *et al.*, 2005). En cèl·lules MEF doble *knockout* de Mfn1 i Mfn2 també s'ha detectat una activitat deficient dels complexos I, II, i III (Chen *et al.*

2005). Aquests canvis no són conseqüència de cap alteració en l'expressió del coactivador nuclear PGC-1 α .

La sobreexpressió de Mfn2 en cèl·lules HeLa provoca una agregació perinuclear dels mitocondris i un important increment del potencial de membrana mitocondrial i de l'oxidació de glucosa (Pich *et al.*, 2005). De la mateixa manera, quan Mfn2 es sobreexpressa en mioblasts L6E9 s'observa un augment en l'expressió de diferents subunitats dels complexos I, IV i V (Pich *et al.*, 2005).

També s'han detectat alteracions metabòliques en fibroblasts de pacients amb determinades mutacions de Mfn2. Així, fibroblasts que presenten les mutacions R364Q o A166T mostren un increment en el consum d'oxigen basal i en la respiració insensible a l'oligomicina, així com una disminució del potencial de membrana mitocondrial. Aquests canvis tenen lloc en condicions en què la massa mitocondrial no es troba alterada i l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria és normal (Loiseau *et al.*, 2007). En canvi, altres mutants de Mfn2 com M21V, T105M, I213T, o V273G no presenten efectes a nivell del metabolisme mitocondrial (Amiott *et al.*, 2008; Loiseau *et al.*, 2007). En l'actualitat es desconeixen els mecanismes pels quals determinades mutacions en Mfn2 causen alteracions metabòliques en fibroblasts humans.

C.4) IMPLICACIÓ DE MFN2 EN DIFERENTS PATOLOGIES

C.4.1) Charcot-Marie-Tooth de tipus 2A (CMT2A)

Charcot-Marie-Tooth (CMT) és una neuropatia motora perifèrica caracteritzada per debilitat i atròfia dels músculs distals, pèrdua de sensibilitat, disminució dels reflexes i deformitat dels peus. CMT és la neuropatia hereditària més comuna, amb una prevalença de 1/2500 individus (Skre, 1974). Aquesta malaltia es classifica en 4 tipus: CMT1, CMT3 i CMT4 són formes desmielinitzants que presenten una velocitat de conducció nerviosa molt disminuïda, mentre que CMT2 és una forma axonal. Aquest últim tipus es caracteritza per una degeneració axonal no associada a la pèrdua de mielina, i en què la velocitat de conducció nerviosa no es troba alterada (Berger *et al.*, 2002; Zuchner *et al.*, 2004). CMT2 presenta una alta variabilitat en la simptomatologia clínica, registrant-se casos de pacients amb símptomes moderats (Lawson *et al.*, 2005) i altres amb símptomes més greus i associats amb atròfia òptica (neuropatia motora i sensorial heretada VI) (Zuchner *et al.*, 2006).

Fins al moment s'han identificat més de 40 mutacions al gen de Mfn2 associades a CMT2A. Les mutacions de Mfn2 són responsables del 20% dels casos de CMT2 (Chung *et al.*, 2006; Verhoeven *et al.*, 2006; Zuchner *et al.*, 2004 i 2006). La majoria de les mutacions descrites són sense sentit i es localitzen al domini GTPasa. També s'han descrit algunes mutacions a l'extrem N-terminal, properes al motiu d'unió a Ras, i altres mutacions en els dominis CC1 i CC2. Les mutacions en el domini GTPasa no afecten els motius G1-G5 ni a la capacitat d'unir GTP.

La naturalesa de les mutacions de Mfn2 que causen CMT2A és heterogènia: alguns mutants mostren guany de funció, mentre que altres presenten pèrdua de funció. Així, la sobreexpressió de determinades formes mutants de Mfn2 (V69F, L76P o W740S) indueix una agregació dels mitocondris en cèl·lules MEF i en neurones del gangli de l'arrel dorsal de rata (Baloh *et al.*, 2007). En canvi, la sobreexpressió d'altres mutants no provoca aquests efectes (Detmer *et al.*, 2007). Altres formes mutants de Mfn2 com R94Q, R94W, T105M, P251A o R280H no presenten activitat de fusió mitocondrial quan se sobreexpressen en cèl·lules MEF KO per Mfn1 i Mfn2 (Detmer *et al.*, 2007). S'ha descrit que l'expressió de Mfn1 pot recuperar l'activitat de fusió mitocondrial dels mutants de Mfn2 interaccionant-hi físicament. La interacció amb Mfn1 explicaria perquè els fibroblasts de la pell de pacients amb CMT2A no presenten alteracions en la xarxa ni en l'estructura mitocondrial (Amiott *et al.*, 2008). L'expressió diferencial de Mfn1, que s'expressa abundantment en fibroblasts però amb nivells baixos d'expressió en el sistema nerviós, podria explicar la diferent susceptibilitat dels diversos teixits davant les mutacions de Mfn2.

El fet que mutacions en Mfn2 provoquin aquesta neuropatia indica que la proteïna Mfn2 és essencial per a la formació i el manteniment de la funció del sistema nerviós. El fenotip obtingut en el model *knockout* condicional de Mfn2 va en consonància amb aquestes dades (Chen *et al.* 2007). L'ablació específica de Mfn2 en el cerebel causa neurodegeneració. Aquests ratolins presenten les cèl·lules de Purkinje amb una ultraestructura i distribució aberrant dels mitocondris, així com defectes en la cadena respiratòria, un desenvolupament reduït de les dendrites i una menor formació de l'espina dorsal. Aquestes alteracions no es veuen compensades per la presència de Mfn1 (Chen *et al.*, 2007).

C.4.2) Paper potencial de Mfn2 en la patofisiologia de l'obesitat i la diabetis de tipus 2

La principal característica de la diabetis de tipus 2 és la resistència a la insulina (Kelley *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2006). La resistència a la insulina precedeix a la malaltia i es considera el millor indicador del seu desenvolupament. Existeix una associació entre obesitat i diabetis de tipus 2 ja que ha estat demostrat que la quantitat de greix corporal és un dels majors determinants de la resistència a la insulina (Larson-Meyer *et al.*, 2006). Tant els pacients obesos com els que pateixen diabetis de tipus 2 mostren inflexibilitat metabòlica (Kelley i Mandarino, 2000) ja que presenten una alta capacitat per oxidar lípids en resposta a la insulina enlloc de canviar cap a l'oxidació de glucosa (Storlien *et al.*, 2004).

La resistència a la insulina està estretament relacionada amb la funció mitocondrial del múscul esquelètic. El número i la mida dels mitocondris presents en aquest teixit són menors en pacients obesos i diabètics de tipus 2 (Kelley *et al.*, 2002; Toledo *et al.*, 2006). Per altra banda, el metabolisme mitocondrial del múscul esquelètic de pacients amb diabetis de tipus 2 es troba alterat i es caracteritza per la desregulació de la fosforilació oxidativa i per la reducció en l'expressió de gens que codifiquen diferents subunitats del sistema OXPHOS (Kelley *et al.*, 2002; Mootha *et al.*, 2003). A part de la diabetis de tipus 2, s'ha descrit disfunció mitocondrial en múscul esquelètic en altres situacions de resistència a la insulina. També s'ha observat una menor expressió de gens que codifiquen proteïnes del sistema OXPHOS en múscul esquelètic d'individus no diabètics però amb antecedents familiars de diabetis de tipus 2 (Petersen *et al.*, 2003; Mootha *et al.*, 2003).

Estudis realitzats al nostre laboratori han demostrat que l'expressió de Mfn2 es troba disminuïda en múscul esquelètic de rates obeses Zucker (Bach *et al.*, 2003). El múscul esquelètic d'aquest model animal d'obesitat mostra un perfil metabòlic caracteritzat per la reducció en la captació i l'oxidació de glucosa, alteracions en la degradació d'àcids grassos, resistència a la insulina i reducció en el consum d'oxigen (Cretazz *et al.*, 1980; Kaplan *et al.*, 1991; Turcotte *et al.*, 2001). A més, també s'hi observà una reducció del 25% de la xarxa mitocondrial. En persones obeses també s'observa una disminució de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic, existint una correlació negativa entre l'expressió de Mfn2 i l'índex de massa corporal (Bach *et al.* 2005).

Els pacients amb diabetis de tipus 2 també presenten una reducció en l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic, tant en el cas d'individus obesos com no obesos. En el nostre laboratori, utilitzant la tècnica del *clamp* d'insulina, s'ha demostrat l'existència d'una correlació positiva entre l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic i la sensibilitat a la insulina (Bach *et al.*, 2005). Per altra banda, el tractament amb TNF α o IL-6 inhibeix l'expressió gènica de Mfn2 en cèl·lules musculars en cultiu (Bach *et al.*, 2005). Aquests dos factors participen en el desenvolupament de la resistència a insulina (Hotamisligil, 1999), i presenten nivells d'expressió més elevats en models animals d'obesitat, de resistència a la insulina i de diabetis de tipus 2 (Hotamisligil *et al.*, 1996; Klover *et al.*, 2003; Rieusset *et al.*, 2004).

Una de les estratègies per millorar la sensibilitat a la insulina és la pèrdua de pes. En aquest sentit, la cirurgia bariàtrica s'ha convertit en una teràpia potencial per la diabetis (Buchwald *et al.*, 2004). La derivació bilio-pancreàtica (BPD) és una tècnica quirúrgica que provoca una pèrdua de pes massiva, millora la sensibilitat a la insulina i regula l'oxidació de substrats modulant l'expressió de diferents gens (Castagneto *et al.*, 1994; Vettor *et al.*, 2003; Guidone *et al.*, 2006). Entre els gens que veuen alterada la seva expressió es troba Mfn2. Els nivells del seu mRNA augmenten en múscul esquelètic d'individus amb obesitat mòrbida després de ser sotmesos a una BPD (Mingrone *et al.*, 2005). Per altra banda, l'exercici crònic també millora la sensibilitat a la insulina, indueix biogènesi mitocondrial i augmenta la funció mitocondrial en múscul esquelètic (Holloszy, 1967; Fitts *et al.*, 1975). En aquesta mateixa línia, l'expressió de Mfn2 es veu incrementada en individus sans que practiquen exercici físic (Cartoni *et al.*, 2005). Així doncs, en situacions clíniques en les que millora la sensibilitat a la insulina, s'observa una inducció en l'expressió gènica de Mfn2.

En el nostre grup s'ha demostrat que el coactivador transcripcional PGC-1 α estimula la transcripció de Mfn2 a través de la interacció amb el receptor nuclear ERR α (Soriano *et al.*, 2006). L'expressió de Mfn2 i de PGC-1 α es troba disminuïda en pacients amb diabetis de tipus 2 i en individus amb resistència a la insulina (Mootha *et al.*, 2003; Bach *et al.*, 2005). Degut al rellevant paper de PGC1- α en la biogènesi mitocondrial i el metabolisme cel·lular, alteracions en PGC-1 α /Mfn2 podrien conferir susceptibilitat al desenvolupament de la resistència a la insulina i a la diabetis de tipus 2.

L'expressió de Mfn2 també s'indueix en situacions en què es requereix una elevada despesa energètica. Així, tant l'exposició al fred com l'administració d'agonistes β -

adrenèrgics a rates provoquen un increment en l'expressió de Mfn2 en el teixit adipós marró i en el múscul esquelètic (Soriano *et al.*, 2006). En aquestes mateixes condicions també es produeix un augment en els nivells d'expressió de PGC-1 α (Puigserver *et al.*, 1998; Boss *et al.*, 1999; Pilegaard *et al.*, 2003). L'estimulació de l'expressió de Mfn2 en aquests teixits en condicions de gran despesa energètica podria ser rellevant en la regulació adaptativa del metabolisme mitocondrial per tal de mantenir l'homeostasi energètica.

C.5) LA FORMA TRUNCADA DE MITOFUSINA 2 HUMANA (hMfn2 Δ 614-757)

Com ja hem comentat a l'apartat C.3.3, la sobreexpressió de Mfn2 en cèl·lules HeLa dona lloc a una agregació perinuclear dels mitocondris i a una activació del metabolisme mitocondrial. Estudis previs han demostrat que l'extrem C-terminal de Mfn2 és crucial per a l'oligomerització i que per tant, una forma de Mfn2 truncada per aquest extrem no mantindria la capacitat d'induir fusió mitocondrial (Rojo *et al.*, 2002; Koshiba *et al.*, 2004).

Per determinar si els efectes induïts per la sobreexpressió de Mfn2 sobre l'activitat mitocondrial eren dependents o no de l'activitat de fusió, en el nostre laboratori es generà una forma de Mfn2 truncada per l'extrem C-terminal (hMfn2 Δ 614-757), que no presenta el domini transmembrana ni el CC2 (Figura 8A). Aquesta forma truncada s'expressà en cèl·lules HeLa i es determinà la seva localització mitjançant immunocitoquímica i *Western Blot*. La forma hMfn2 Δ 614-757 es detectà tant a la fracció mitocondrial com al citosol (Figures 8B i 8C). La sobreexpressió de la hMfn2 Δ 614-757 en cèl·lules HeLa no altera la morfologia de la xarxa mitocondrial però sí que presenta efectes metabòlics: concretament, estimula l'oxidació de glucosa i incrementa el potencial de membrana mitocondrial (Figura 8D i 8E) (Pich *et al.*, 2005). Els resultats obtinguts en sobreexpressar la hMfn2 Δ 614-757 en cèl·lules HeLa suggereixen que els efectes estimuladors de Mfn2 sobre el metabolisme mitocondrial no són totalment dependents de la seva activitat de fusió mitocondrial.

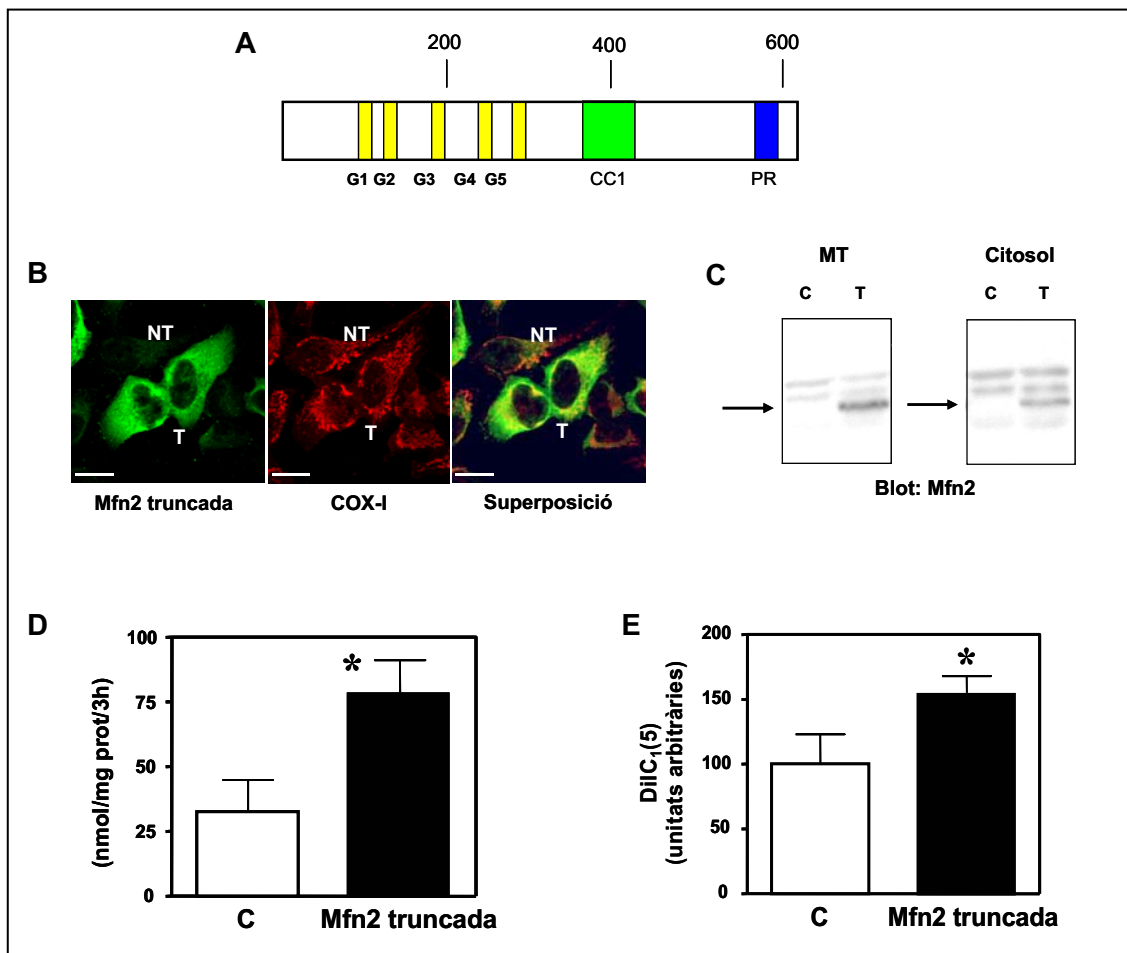


Figura 8. Expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en cèl·lules HeLa. (A) Esquema de la hMfn2 Δ 614-757. En groc es mostren els 5 motius (G1-G5) del domini GTPasa, en verd el domini CC1 i en blau el domini ric en prolines (PR). Aquesta forma no presenta el domini transmembrana ni el CC2 (Figura 6A). (B) La immunocitoquímica mostra la colocalització parcial de la forma truncada de Mfn2 amb el marcador mitocondrial COX-I (citocrom c oxidasa). T: cèl·lules transfectades; NT: cèl·lules no transfectades. (C) Anàlisi *Western Blot* de les fraccions mitocondrial (MT) i citosòlica de cèl·lules control (C) i cèl·lules transfectades amb la hMfn2 Δ 614-757 (T). La fletxa assenjala la banda corresponent a la hMfn2 Δ 614-757. (D) Oxidació de glucosa expressada en nmol / mg de proteïna en 3 hores de cèl·lules control i cèl·lules que sobreexpressen la hMfn2 Δ 614-757. (E) Potencial de membrana mitocondrial determinat amb la sonda DiIC₁(5). (Pich *et al.*, 2005). * indica diferències estadísticament significatives respecte el control amb $p < 0,05$ d'una prova t Student.

OBJECTIUS

La proteïna mitofusina 2 és important en el manteniment de la xarxa mitocondrial a través de la seva activitat de fusió. Diferents estudis en cèl·lules en cultiu indiquen però, que Mfn2 també tindria un paper fonamental en el control del metabolisme mitocondrial. Per altra banda, l'expressió de Mfn2 es troba disminuïda en múscul esquelètic en situacions de resistència a la insulina, com l'obesitat i la diabetis de tipus 2, que a la vegada es caracteritzen per una alterada activitat mitocondrial.

Sobre la base d'aquestes observacions, l'objectiu general de la present tesi doctoral ha estat estudiar els efectes de la modulació de l'expressió de Mfn2 sobre el metabolisme i la bioenergètica mitocondrial en múscul esquelètic. Per dur a terme aquest objectiu hem expressat la forma truncada hMfn2 Δ 614-757, o bé hem reprimit l'expressió de Mfn2 endògena, en el model cel·lular muscular C2C12 i en diferents models de ratolí generats durant la realització d'aquesta tesi doctoral. Aquesta darrera aproximació és especialment rellevant, ja que és el primer cop que s'estudia el paper de Mfn2 sobre el metabolisme mitocondrial de múscul esquelètic en un model animal. Així doncs, els objectius parcials han estat els següents:

1- Estudiar l'impacte de la sobreexpressió de la forma truncada de Mfn2 (hMfn2 Δ 614-757), i de la repressió de Mfn2, sobre el metabolisme mitocondrial en miotubs C2C12.

2- Analitzar els efectes en el metabolisme mitocondrial de múscul esquelètic de ratolí de la sobreexpressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757.

3- Analitzar els efectes de la pèrdua de funció de Mfn2 en múscul esquelètic de ratolí, avaluant la possible relació entre la deficiència en l'expressió d'aquesta proteïna, la disfunció mitocondrial i la resistència a la insulina.

RESULTATS

A) ESTUDI DEL PAPER FISIOLÒGIC DE MITOFUSINA 2 EN EL MODEL CEL·LULAR C2C12

A.1) MODEL UTILITZAT

En primer lloc, amb l'objectiu d'estudiar els efectes de la modulació de la proteïna mitofusina 2 (Mfn2) sobre el metabolisme i la bioenergètica muscular, vam utilitzar com a model cel·lular la línia C2C12, derivada de cèl·lules satèl·lit de múscul esquelètic de ratolí.

Per tal d'evitar possibles efectes relacionats amb la dinàmica mitocondrial que poguessin afectar a la miogènesi, i perquè el model fos el més proper possible a la fibra muscular adulta, vam decidir treballar amb cèl·lules ja diferenciades. D'aquesta manera, les cèl·lules van ser transduïdes amb els adenovirus corresponents el dia 3 de diferenciació, quan ja s'observen els primers miotubs, i els experiments van ser realitzats al cap de 48 hores de la transducció, és a dir, el cinquè dia de diferenciació, quan les cèl·lules es troben totalment diferenciades (apartat A.3.2 de Materials i Mètodes). En tots els experiments realitzats es va comprovar que els mioblasts C2C12 havien diferenciat correctament a miotubs (Figura 9).

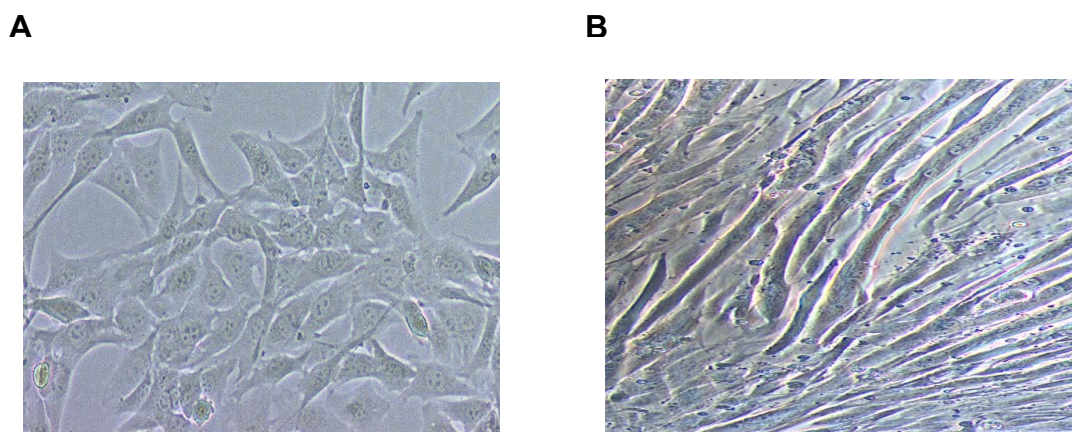


Figura 9. Comprovació de la diferenciació de les cèl·lules C2C12. (A) Mioblasts C2C12. (B) Miotubs C2C12 a dia 5 de diferenciació. Aquest control es realitzà abans de començar els diferents experiments. Els pous on les cèl·lules C2C12 no mostraven una total diferenciació eren descartats.

A.2) ESTUDI DELS EFECTES DE LA SOBREEXPRESSIONI DE LA FORMA hMfn2 Δ 614-757 SOBRE EL METABOLISME DE LES CÈL·LULES C2C12

Per analitzar possibles efectes en la funció mitocondrial lligats a la sobreexpressió de Mfn2 es va decidir expressar en miotubs C2C12 una forma truncada de Mfn2 humana: hMfn2 Δ 614-757 (Pich, 2004). A aquesta forma li manca l'extrem C-terminal que comprèn els dominis transmembrana i *coiled-coil 2* (apartat C.5 de la Introducció). Es va escollir treballar amb aquesta forma perquè resultats previs obtinguts en el nostre laboratori indiquen que la seva sobreexpressió en cèl·lules HeLa estimula el metabolisme sense modificar la xarxa mitocondrial, com sí succeeix en sobreexpressar la Mfn2 salvatge (Pich *et al.*, 2005).

A.2.1) Comprovació de l'eficiència de transducció

Abans d'analitzar els efectes de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre el metabolisme mitocondrial de les cèl·lules C2C12 vàrem comprovar que l'estratègia d'expressió escollida funcionava. Miotubs a dia 3 de diferenciació van ser transduïts amb un adenovirus control (Adv-GFP) o amb l'adenovirus que sobreexpressa la forma truncada de Mfn2 (Adv-Mfn2 Δ) a una MOI de 200 virus per cèl·lula. El dia 5 de diferenciació es van lisar les cèl·lules, es van obtenir homogenats totals i es va analitzar l'expressió de Mfn2 mitjançant *Western Blot* (apartat F.3 de Materials i Mètodes). Com es pot observar a la figura 10A, es detectà una banda d'uns 75kDa corresponent a la hMfn2 Δ 614-757 que no apareixia en les cèl·lules transduïdes amb l'adenovirus control. L'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 fou entre 20 i 30 cops superior a l'expressió de la Mfn2 endògena en tots els experiments realitzats. En aquestes condicions, no s'observaren canvis en l'expressió de Mfn2 endògena ni en la quantitat de la proteïna mitocondrial porina (VDAC) (Figura 10B). Aquesta proteïna s'expressa de manera abundant i és àmpliament emprada com a marcador de la quantitat de mitocondris d'una mostra.

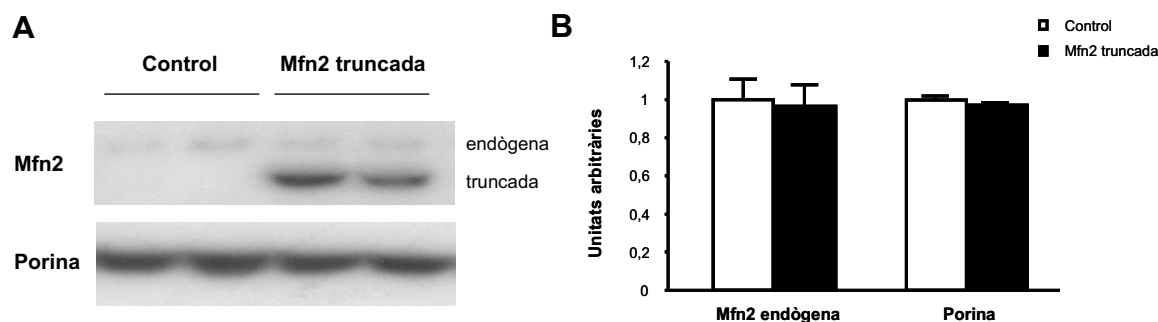


Figura 10. Expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en miotubs C2C12. (A) Anàlisi per *Western Blot* de 40 μ g de proteïna provinents de lisats totals de miotubs C2C12 transduïts amb un adenovirus control o amb la forma truncada de Mfn2. (B) Quantificació per densitometria de l'expressió de Mfn2 endògena i de porina. El gràfic mostra la mitja i l'error estàndard corresponent a 4 experiments independents.

A.2.2) Efectes de la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en la taxa de consum d'oxigen

Per fer una caracterització general del metabolisme cel·lular es va mesurar la taxa de consum d'oxigen de miotubs C2C12 utilitzant el *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience). Aquest sistema permet fer les mesures amb les cèl·lules adherides a la placa, i per tant és molt útil en el cas de cèl·lules diferenciades.

S'emprà un protocol estàndard que, mitjançant l'addició successiva de diversos compostos, permet avaluar la respiració cel·lular en diferents estats, descrits detalladament a l'apartat B.1.1 de Materials i Mètodes. Tots els compostos utilitzats són permeables a la membrana plasmàtica, de manera que els experiments es duen a terme amb les cèl·lules intactes, sense necessitat de permeabilitzar-les. En la situació més fisiològica possible, anomenada respiració de rutina (R), les cèl·lules consumeixen oxigen a partir de l'oxidació dels substrats presents al medi. Seguidament s'afegeix oligomicina, inhibidor de l'ATP sintasa, i s'obté la respiració no destinada a la síntesi d'ATP o *proton leak* (L). En segon lloc s'afegeix el desacoblant FCCP, que estimula la respiració, reflectint la capacitat màxima del sistema de transport electrònic (E). Per últim, s'addiciona rotenona i antimicina A, inhibidors del complex I i del complex III de la cadena respiratòria, respectivament, per tal d'obtenir la respiració no mitocondrial (rox o *residual oxygen consumption*). Les concentracions utilitzades d'oligomicina, FCCP, rotenona i antimicina A varen ser optimitzades en experiments previs durant la realització d'aquesta tesi doctoral (resultats no mostrats). La taxa de consum d'oxigen

de miotubs C2C12 es va mesurar en 3 experiments independents. En la figura 11 es mostren els resultats obtinguts en un d'aquests experiments.

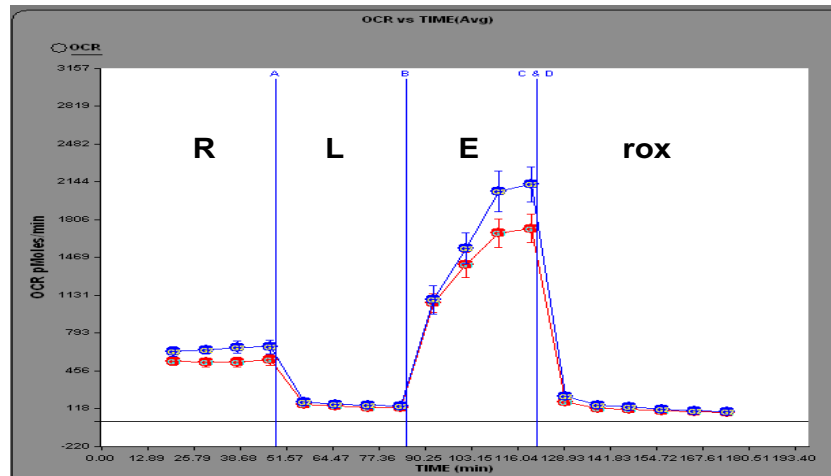


Figura 11. Mesura del consum d'oxigen en miotubs C2C12. Es va mesurar el consum d'oxigen de miotubs transduïts amb Adv-GFP (control; en vermell) i de miotubs que sobreexpressen la forma truncada de Mfn2 (en blau) en diferents estats respiratoris: rutina (R), *proton leak* (L), capacitat màxima del sistema de transport electrònic (E) i respiració no mitocondrial (rox). Les marques blaves verticals indiquen el moment en què s'ha afegit, d'esquerra a dreta, oligomicina, FCCP i rotenona + antimicina A. El gràfic mostra la mitja, amb el seu error estàndard, del consum d'oxigen expressat en pmol O₂/min. Imatge representativa de 3 experiments independents, cadascun amb 10 rèpliques per condició. L'eix vertical assenyala la taxa de consum d'oxigen (pmol/min) i l'horitzontal el temps (min).

Els miotubs transduïts amb l'adenovirus control presentaren una respiració en la situació de rutina de $20,4 \pm 1,27$ pmol O₂ / min·µg de proteïna. La inhibició del complex V amb oligomicina reduí el consum d'oxigen a $6,0 \pm 0,31$ pmol O₂ / min·µg, mentre que el desacoblant FCCP estimulà la respiració fins a $76,9 \pm 5,76$ pmol O₂ / min·µg. Aquests resultats indiquen que els miotubs C2C12 presenten una elevada capacitat respiratòria de reserva respecte la respiració de rutina. El consum d'oxigen residual, o no mitocondrial, obtingut després d'inhibir els complexos I i III amb rotenona i antimicina A respectivament, fou de $4,2 \pm 0,24$ pmol O₂ / min·µg (Figura 12).

Els miotubs que sobreexpressen la forma truncada de Mfn2 mostraren un increment significatiu ($p < 0,05$) del consum d'oxigen respecte els controls en tots els estats analitzats. Així, els valors de respiració obtinguts en aquestes cèl·lules va ser de $25,9 \pm 1,58$ pmol O₂ / min·µg en rutina; $7,2 \pm 0,49$ pmol O₂ / min·µg inhibint el complex V amb oligomicina; $97,1 \pm 7,6$ pmol O₂ / min·µg desacoblant amb FCCP i $5,2 \pm 0,31$ pmol O₂ / min·µg de consum no mitocondrial (rox) (Figura 12).

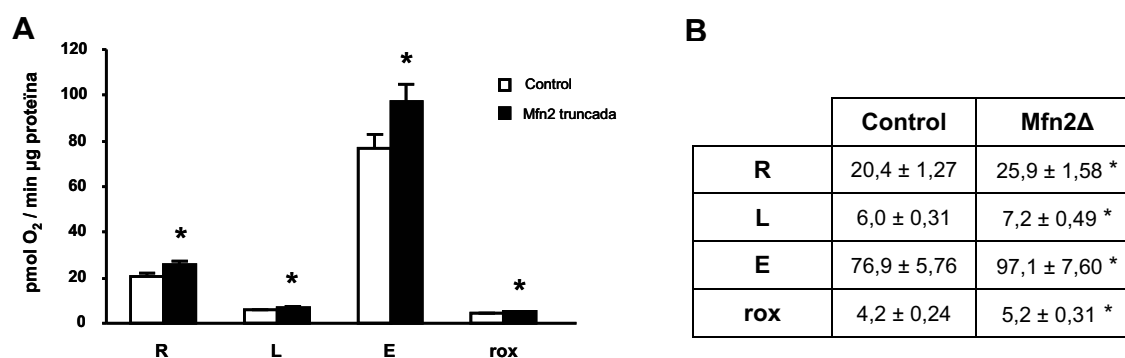


Figura 12. Efecte de la sobreexpressió de hMfn2Δ614-757 sobre el consum d'oxigen en miotubs C2C12. (A) Taxa de consum d'oxigen mesurada en els diferents estats respiratoris: rutina (R), *proton leak* (L), capacitat màxima del sistema de transport electrònic (E) i respiració no mitocondrial (rox). Els resultats obtinguts van ser corregits per la quantitat de proteïna de cada pou i són les mitges ± error estàndard de 3 experiments independents. * indica diferències estadísticament significatives respecte el control amb $p < 0,05$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució. (B) Taula amb els valors absoluts de consum d'oxigen obtinguts en cada estat respiratori ($\text{pmol O}_2 / \text{min} \cdot \mu\text{g prot}$) provinents de la figura 12A.

El consum d'oxigen corresponent a l'estat rox es va sostroure dels valors obtinguts pels estats R, L i E per tal d'obtenir exclusivament la respiració mitocondrial. Com es pot apreciar a la figura 13, els miotubs transduïts amb l'Adv-Mfn2Δ presentaren un increment del 25% en el consum d'oxigen mitocondrial tant en rutina com en desacoblar la cadena respiratòria de la síntesi d'ATP amb FCCP. Aquestes diferències són estadísticament significatives ($p < 0,05$) i indiquen que les cèl·lules que sobreexpressen hMfn2Δ614-757 consumeixen més oxigen en una situació fisiològica (R) i a més, que tenen una capacitat respiratòria més elevada que les cèl·lules control.

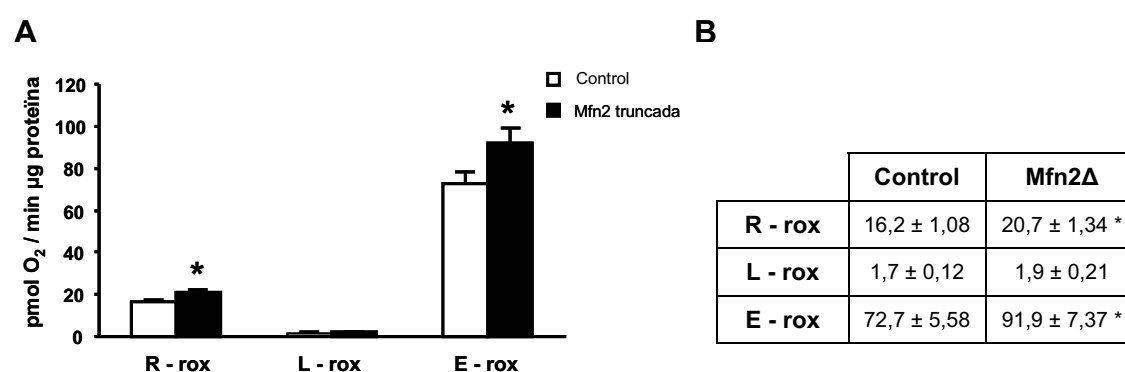


Figura 13. Efecte de la sobreexpressió de hMfn2Δ614-757 sobre el consum d'oxigen mitocondrial en miotubs C2C12. (A) Els valors de consum d'oxigen mitocondrial en cada estat (R, L i E) s'obtenen de restar el valor de rox dels valors mostrats a la figura 12B. Els resultats són mitges ± errors estàndard de 3 experiments independents i s'expressen com a $\text{pmol O}_2 / \text{min} \cdot \mu\text{g}$ de proteïna. * indica diferències estadísticament significatives respecte el control amb $p < 0,05$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució. (B) Taula amb els valors absoluts de consum d'oxigen mitocondrial obtinguts en cada estat respiratori ($\text{pmol O}_2 / \text{min} \cdot \mu\text{g prot}$) provinents de la figura 13A.

A partir dels valors de consum d'oxigen mitocondrial (Figura 13B) es van calcular diferents *Flux Control Ratios* descrites a l'apartat B.1.1 de Materials i Mètodes, que ens donen informació sobre el grau d'acoblament entre la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. Concretament, es varen calcular la *Routine Flux Control Ratio* (R/E), la *Leak Flux Control Ratio* (L/E) i la *Phosphorylation Respiratory Control Ratio* ($RCR_p = (R-L)/E$) (Figura 14).

Els resultats obtinguts per la *Routine Flux Control Ratio*, si els expressem en percentatge, indiquen que tant els miotubs C2C12 control com els que sobreexpressen la forma truncada de Mfn2 només utilitzen un 23% de la capacitat del sistema de transport electrònic en la respiració de rutina, i que per tant, tenen una alta capacitat respiratòria de reserva respecte el que consumeixen en condicions fisiològiques. Per altra banda, la *Phosphorylation Respiratory Control Ratio* i la *Leak Flux Control Ratio* assenyalen un fort acoblament del sistema OXPHOS en miotubs C2C12 independentment de la sobreexpressió de Mfn2 truncada. Aproximadament un 21% de la capacitat respiratòria màxima s'utilitza per a la producció d'ATP tant en miotubs control com en miotubs transduïts amb Adv- Δ Mfn2, mentre que la respiració no acoblada a la síntesi d'ATP (*proton leak*) representa menys del 3% en ambdós grups.

Com es pot comprovar a la figura 14, no s'observaren diferències significatives en cap d'aquestes *ratios* entre miotubs control i miotubs que sobreexpressen la hMfn2 Δ 614-757. Així, la sobreexpressió de la forma truncada de Mfn2 en cèl.lules C2C12 provoca un augment del consum d'oxigen en rutina, degut a una major capacitat del sistema de transport electrònic, però sense produir canvis en el grau d'acoblament del sistema de transport electrònic i la producció d'ATP.

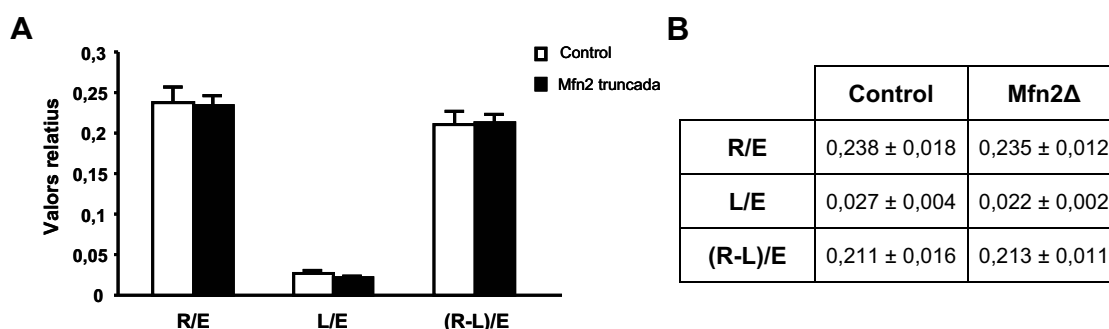


Figura 14. Efecte de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 en les *Flux Control Ratios* en miotubs C2C12. **(A)** La *Routine Flux Control Ratio* (R/E), la *Leak Flux Control Ratio* (L/E) i la *Phosphorylation Respiratory Control Ratio* ((R-L)/E) es van calcular a partir dels valors de consum d'oxigen mitocondrial obtinguts (Figura 13B). R: respiració en rutina, L: consum d'oxigen en inhibir l'ATP sintasa i E: respiració màxima obtinguda en afegir el desacoblant FCCP. **(B)** Taula amb els valors de les *Flux Control Ratios*. Els resultats són mitges \pm error estàndard de 3 experiments independents.

A.2.3) Efectes de la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en el potencial de membrana mitocondrial

Al cap de 48 hores de la transducció de miotubs C2C12 amb els Adv-GFP o els Adv-Mfn2 Δ es va mesurar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) mitjançant el marcatge amb la sonda TMRM. Aquestes mesures es varen analitzar en presència o absència de CCCP (apartat B.2 de Materials i Mètodes). L'addició de CCCP 30 μ M als miotubs C2C12 dissipa el potencial de membrana mitocondrial i disminueix el marcatge de la sonda un 50%. La diferència entre els valors de fluorescència obtinguts sense i amb CCCP correspon a la sonda incorporada específicament als mitocondris en funció del seu potencial de membrana.

No s'observaren diferències significatives en els nivells de fluorescència detectats entre els 2 grups (Figura 15) indicant que en aquest model cel·lular la sobreexpressió de la forma truncada de Mfn2 no produeix canvis a nivell de $\Delta\Psi$ mitocondrial.

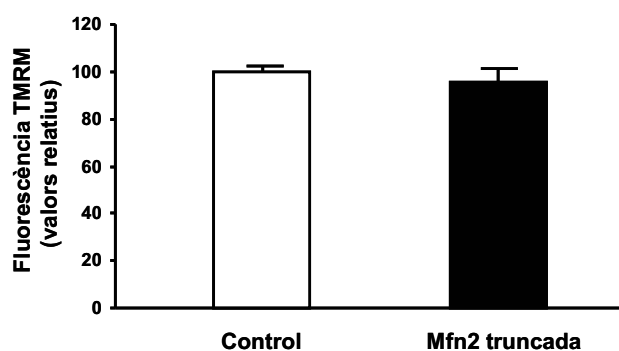


Figura 15. Efecte de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) en cèl·lules C2C12. Les cèl·lules foren incubades amb TMRM 100 nM durant 30 minuts a 37°C. Les barres mostren la mitja dels valors, i el seu error estàndard, de la resta dels nivells de fluorescència sense i amb 30 μ M de CCCP de 3 experiments independents realitzats per triplicat. S'emprà la resta dels valors de fluorescència, ja que la fluorescència perduda pel tractament amb el desacoblant CCCP és l'acumulada específicament degut al potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). Els resultats s'expressen relatius al control.

A.2.4) Efectes de la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en l'oxidació de palmitat

D'acord amb els resultats obtinguts en els experiments de respirometria (apartat A.2.2 de Resultats) els miotubs que sobreexpressen la forma truncada de Mfn2 consumeixen més oxigen que els miotubs control en situació de rutina. Aquest consum es produeix a partir de la glucosa present al medi de cultiu (5,5 mM de concentració).

Per comprovar si la capacitat oxidativa també es trobava augmentada quan s'utilitzen àcids grassos enlloc d'hidrats de carboni com a substrat, es varen realitzar experiments d'oxidació de palmitat.

La realització d'aquests assajos es va dur a terme afegint [¹⁴C]-(U)-Palmitat, a una concentració final de 0,25 mM, al medi d'incubació de les cèl·lules. Per poder calcular la taxa d'oxidació de palmitat es va mesurar el CO₂ marcat radioactivament capturat al paper de filtre. Per altra banda també s'analitzà la radioactivitat present al medi després de l'assaig, que conté els anomenats ASP (*acid-soluble products*), per estimar l'oxidació incompleta de palmitat (apartat B.3 de Materials i Mètodes). Els miotubs control presentaren una taxa d'oxidació completa de palmitat de 7,16 ± 0,32 nmol / 3h·mg de proteïna, mentre que en els miotubs que sobreexpressen la forma truncada l'oxidació fou de 7,22 ± 0,52 nmol / 3h·mg de proteïna. La taxa d'oxidació incompleta de palmitat fou de 11,45 ± 0,32 nmol / 3h·mg de proteïna en els controls i de 10,88 ± 0,52 nmol / 3h·mg de proteïna en els miotubs transduïts amb l'Adv-Mfn2Δ. En cap dels dos casos s'observaren diferències significatives (Figura 16).

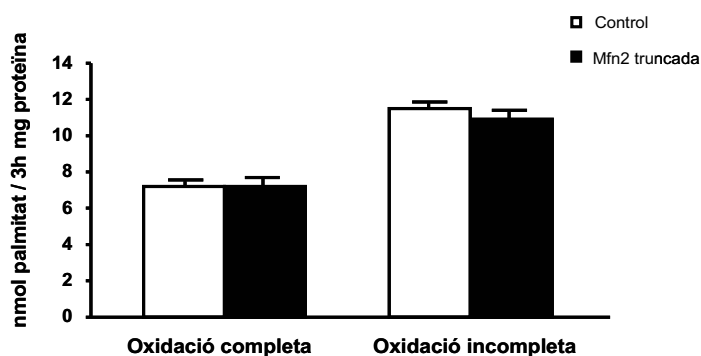


Figura 16. Efecte de la sobreexpressió de hMfn2Δ614-757 en l'oxidació de palmitat en miotubs C2C12. Es va determinar l'oxidació de palmitat en miotubs control i miotubs transduïts amb la forma truncada de Mfn2. Els resultats són mitges ± errors estàndard de 3 experiments independents, amb 3 rèpliques cada un, i s'expressen com a nmols de palmitat oxidat durant 3 h per mg de proteïna.

A.2.5) Efectes de la sobreexpressió de la forma hMfn2Δ614-757 en l'expressió de subunitats dels complexos de la cadena respiratòria

Per comprovar si l'augment de la capacitat respiratòria observat en els miotubs C2C12 transduïts amb Adv-Mfn2Δ era degut a un major funcionament de la cadena de transport electrònic lligat a una major expressió d'algun dels seus components, es varen analitzar a nivell proteic i a nivell d'ARN missatger diferents subunitats dels complexos

de la cadena respiratòria (Figura 17). A partir d'homogenats totals de miotubs control i miotubs que sobreexpressen la forma truncada de Mfn2, es van analitzar per *Western Blot* els nivells d'expressió de les subunitats Ndufa9, SdhA, Uqcrc2, CoxIV i Atp5a1 dels complexos I, II, III, IV i V, respectivament (Figura 17A). La quantificació per densitometria de les bandes corresponents va mostrar que no existien diferències significatives en l'expressió d'aquestes subunitats a nivell proteic en sobreexpressar la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 (Figura 17B). Per altra banda, també es varen quantificar els nivells d'ARN missatger per *real-time PCR* de les mateixes subunitats analitzades per *Western Blot* i tampoc es detectaren diferències significatives (Figura 17C).

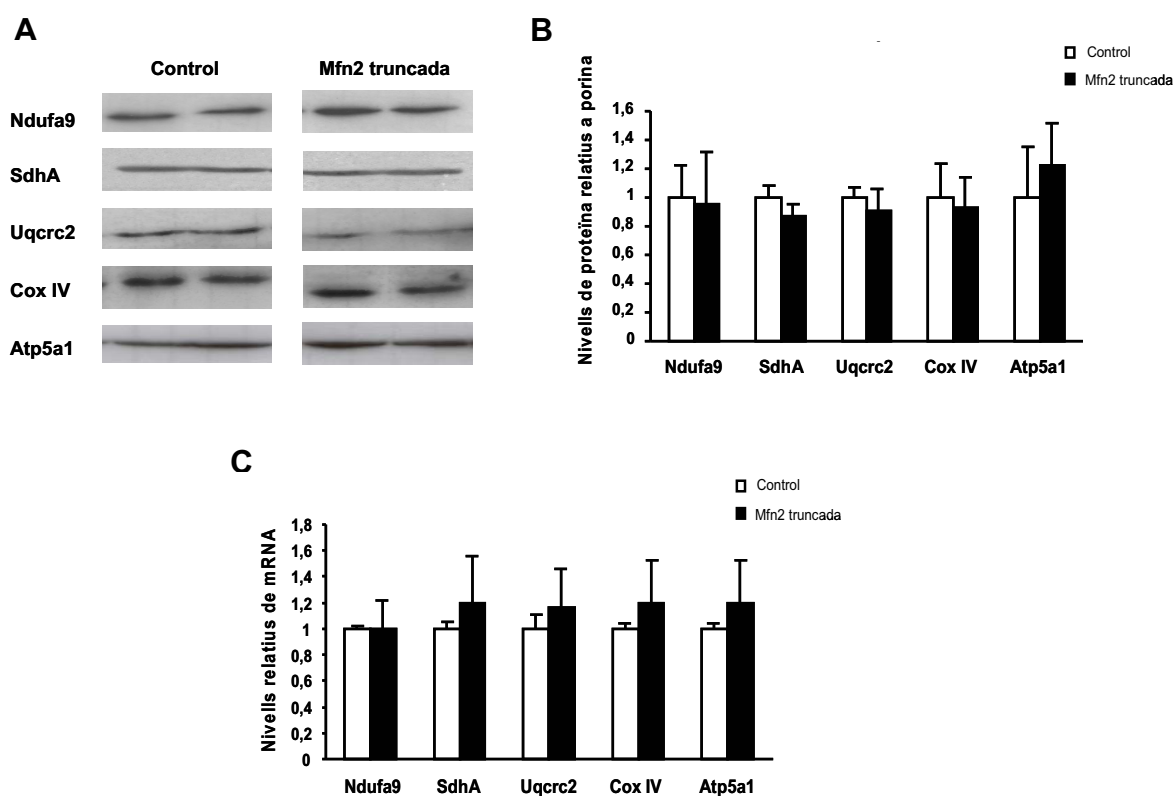


Figura 17. Efecte de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre l'expressió dels complexos de la cadena respiratòria en cèl·lules C2C12. (A) Anàlisi per *Western blot* de les subunitats Ndufa9 (complex I), SdhA (complex II), Uqcrc2 (complex III), CoxIV (complex IV) i Atp5a1 (complex V) en homogenats totals de miotubs control i miotubs que sobreexpressen la forma truncada de Mfn2 (40 μ g de proteïna). **(B)** Quantificació per densitometria de les subunitats dels complexos. Els resultats provenen de 3 experiments independents. Es mostra la mitja, i el seu error estàndard, dels nivells de cada proteïna relatiu a l'expressió de la proteïna mitocondrial porina. **(C)** *Real-time PCR* de les subunitats dels complexos. Les barres mostren la mitja, i el seu error estàndard, dels nivells de cada gen relatiu als de β -actina, gen utilitzat com a *housekeeping*.

A.3) ESTUDI DELS EFECTES DE LA REPRESSIÓ DE MFN2 SOBRE EL METABOLISME DE LES CÈL·LULES C2C12

Per estudiar els efectes de la repressió de l'expressió de Mfn2 sobre el metabolisme cel·lular, es van transduir miotubs C2C12 a dia 3 de diferenciació amb un adenovirus que codifica 5 microRNAs específics (Adv-miRNA Mfn2) contra la seqüència de Mfn2 de ratolí. Com a control, es va utilitzar un adenovirus que contenia 5 còpies d'un miRNA control (Adv-miRCtrl).

A.3.1) Comprovació de l'eficiència de transducció

Abans d'analitzar els efectes de la repressió de Mfn2 sobre el metabolisme mitocondrial de les cèl·lules C2C12 fou important comprovar que l'estratègia dissenyada era eficient. Per fer-ho, es mesurà la caiguda de Mfn2 a nivell de proteïna (Figures 18A i 18B) i d'ARN missatger (Figura 18C) per *Western Blot* i *real-time PCR*, respectivament. La repressió de l'expressió de Mfn2 és d'entre el 70 i el 80%, tant a nivell de proteïna com de mRNA, demostrant la validesa de les eines emprades. Per altra banda es va analitzar per WB l'expressió de la proteïna mitocondrial porina (Figures 18A i 18B), no observant-se diferències i suggerint per tant, que la repressió de Mfn2 no altera la quantitat de mitocondris de les cèl·lules.

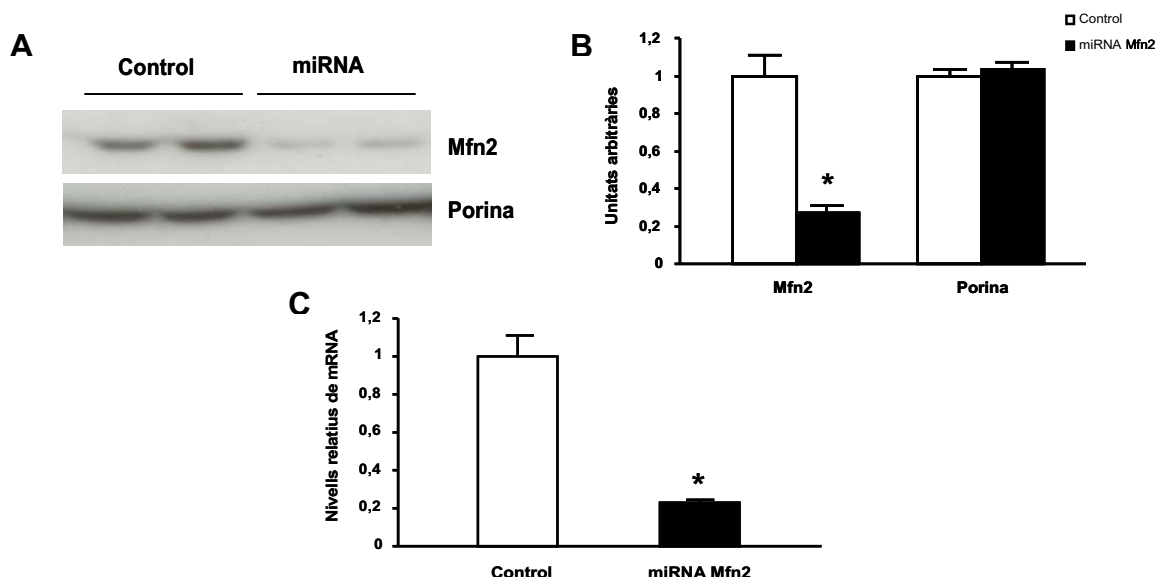


Figura 18. Repressió de Mfn2 en miotubs C2C12. (A) Anàlisi per *Western Blot* de 40µg de proteïna provinents de fraccions enriquides en mitocondris de miotubs C2C12 transduïts amb Adv-miRctrl o amb Adv-miRNAMfn2. (B) Quantificació per densitometria de l'expressió de Mfn2 i de porina. El gràfic mostra la mitja, i el seu error estàndard, de 4 experiments independents. (C) Mesura dels nivells de missatger de Mfn2 mitjançant *real-time PCR*. El gràfic mostra la mitja i l'error estàndard dels nivells d'expressió de Mfn2 relatius a β-actina (gen emprat com a *housekeeping*). * indica diferències estadísticament significatives amb p<0,05 d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

A.3.2) Efectes de la repressió de Mfn2 en la taxa de consum d'oxigen

Per analitzar l'impacte de la disminució en l'expressió de Mfn2 sobre el metabolisme energètic cel·lular es van dur a terme experiments de respirometria com els descrits a l'apartat 1.2.2 de Resultats. En la figura 19 es mostren els resultats obtinguts en un d'aquests experiments.

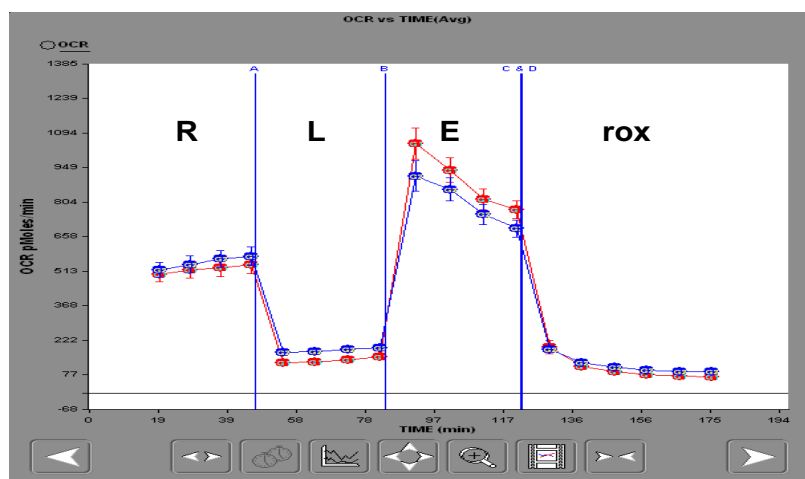


Figura 19. Experiment representatiu de la mesura del consum d'oxigen en miotubs C2C12 en reprimir Mfn2. Es va mesurar el consum d'oxigen de miotubs control (en vermell) i de miotubs transduïts amb Adv-miRNAMfn2 (en blau) en diferents estats respiratoris: rutina (R), *proton leak* (L), capacitat màxima del sistema de transport electrònic (E) i respiració no mitocondrial (rox). Les marques blaves verticals indiquen el moment en què s'ha afegit, d'esquerra a dreta, oligomicina, FCCP i rotenona + antimicina A. El gràfic mostra la mitja, amb el seu error estàndard, del consum d'oxigen expressat en pmol/min. Imatge representativa de 3 experiments independents, cadascun amb 10 rèpliques per condició. L'eix vertical assenyalava la taxa de consum d'oxigen (pmol/min) i l'horitzontal el temps (min).

Els miotubs amb menor expressió de Mfn2 presentaven un consum d'oxigen més elevat que els miotubs transduïts amb Adv-miRCtrl, tant en la situació de rutina ($23,7 \pm 1,19$ pmol O_2 / min· μ g enfront $18,9 \pm 0,99$ pmol O_2 / min· μ g dels controls) com quan s'inhibí l'ATP sintasa amb oligomicina ($8,8 \pm 0,66$ pmol O_2 / min· μ g en els miRNA versus Mfn2 i $5,2 \pm 0,25$ pmol O_2 / min· μ g dels controls) (Figura 20). En canvi, la capacitat respiratòria màxima no es trobà alterada. Així, els valors obtinguts en afegir el desacoblant FCCP foren de $62,7 \pm 6,19$ pmol O_2 / min· μ g en els miotubs transduïts amb Adv-miRNAMfn2 i de $64,1 \pm 7,15$ pmol O_2 / min· μ g en els controls. El consum d'oxigen residual, o no mitocondrial, obtingut després d'inhibir els complexos I i III amb rotenona i antimicina A, respectivament, també fou significativament més alt en el cas de la repressió de l'expressió de Mfn2 ($5,6 \pm 0,51$ pmol O_2 / min· μ g) que en els miotubs control ($3,2 \pm 0,19$ pmol O_2 / min· μ g) (Figura 20).

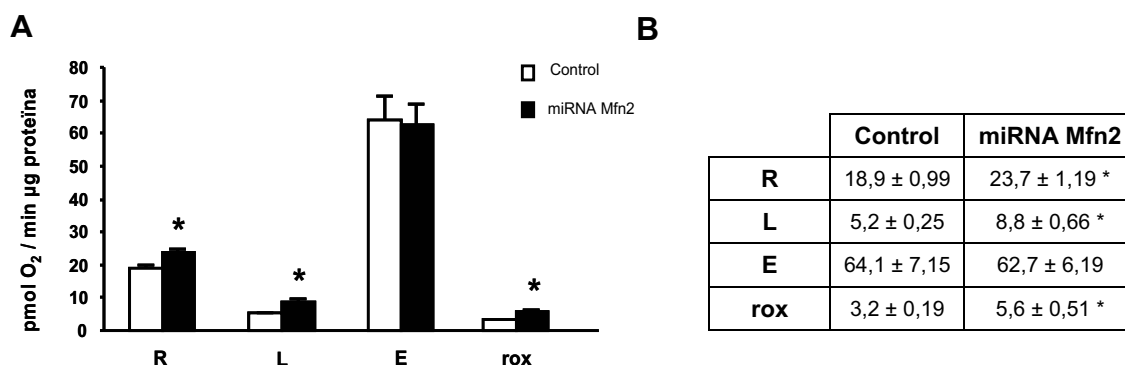


Figura 20. Efecte de la repressió de Mfn2 sobre el consum d'oxigen en miotubs C2C12. (A) Taxa de consum d'oxigen en miotubs C2C12 mesurada en els diferents estats respiratoris: rutina (R), *proton leak* (L), capacitat màxima del sistema de transport electrònic (E) i respiració no mitocondrial (rox). Els resultats obtinguts van ser corregits per la quantitat de proteïna de cada pou i són les mitges ± error estàndard de 3 experiments independents. * indica diferències estadísticament significatives respecte el control amb $p < 0,05$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució. (B) Taula amb els valors absoluts de consum d'oxigen obtinguts en cada estat respiratori ($\text{pmol O}_2 / \text{min} \cdot \mu\text{g prot}$) provinents de la figura 20A.

El valor de rox es va sotstraure dels valors de consum d'oxigen dels estats R, L i E per tal d'obtenir exclusivament la respiració mitocondrial. Com es pot apreciar a la figura 21, els miotubs transduïts amb Adv-miRNAMfn2 presentaren un increment del 15% en el consum d'oxigen mitocondrial en la situació de rutina (R) i del 60% en inhibir el complex V amb oligomicina (L). Aquestes diferències són estadísticament significatives ($p < 0,05$) i indiquen que les cèl·lules amb menor expressió de Mfn2 presenten un fort augment en el *proton leak* respecte les cèl·lules control.

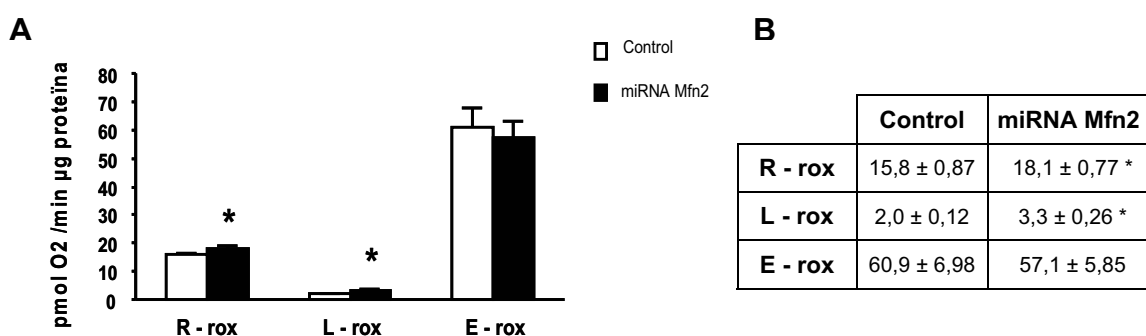


Figura 21. Efecte de la repressió de Mfn2 sobre el consum d'oxigen mitocondrial en miotubs C2C12. (A) Els valors de consum d'oxigen mitocondrial en cada estat (R, L i E) s'obtenen de restar el valor de rox dels valors corresponents de la figura 20B. Els resultats són mitges ± errors estàndard de 3 experiments independents i s'expressen com a $\text{pmol O}_2 / \text{min} \cdot \mu\text{g}$ de proteïna. * indica diferències estadísticament significatives respecte el control amb $p < 0,05$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució. (B) Taula amb els valors absoluts de consum d'oxigen mitocondrial obtinguts en cada estat respiratori ($\text{pmol O}_2 / \text{min} \cdot \mu\text{g prot}$) provinents de la figura 21A.

A partir dels valors de consum d'oxigen mitocondrial es van calcular les *Flux Control Ratios* descrites a l'apartat B.1.1 de Materials i Mètodes, que ens donen

informació sobre el grau d'acoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. Respecte a la *Routine Flux Control Ratio* (R/E) i la *Phosphorylation Respiratory Control Ratio* ($RCR_p = (R-L)/E$) s'observà una tendència a estar augmentades en els miotubs amb menor expressió de Mfn2, malgrat que aquestes diferències no foren significatives (Figura 22).

En canvi, si que s'observaren diferències estadísticament significatives ($p < 0,01$) en la *Leak Flux Control Ratio* (L/E), indicant un augment del *proton leak* en els miotubs transduïts amb Adv-miRNAMfn2. Mentre que en els miotubs control la respiració no acoblada a la síntesi d'ATP (*proton leak*) representa aproximadament el 4% de la capacitat respiratòria màxima, en els miotubs amb disminució de l'expressió de Mfn2 aquest valor arriba al 7%. Així, la disminució de l'expressió de Mfn2 provoca un augment del consum d'oxigen en rutina, que s'explica bàsicament per l'increment en el *proton leak*.

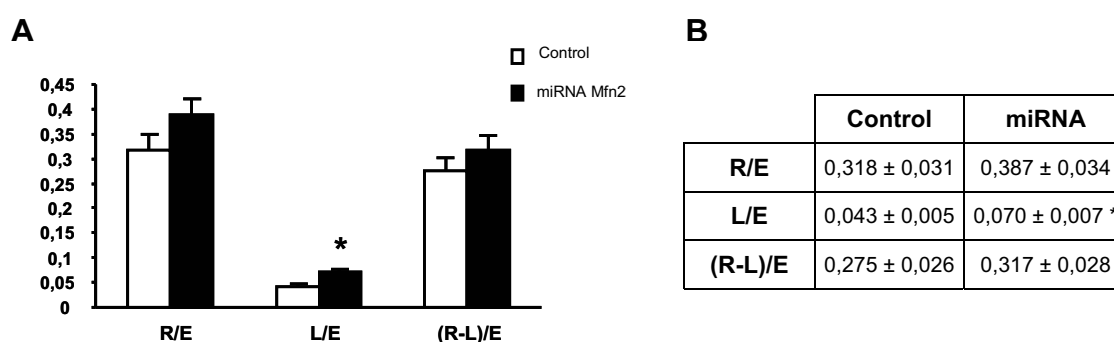


Figura 22. Efecte de la repressió de Mfn2 en les *Flux Control Ratios* en cèl·lules C2C12. **(A)** La *Routine Flux Control Ratio* (R/E), la *Leak Flux Control Ratio* (L/E) i la *Phosphorylation Respiratory Control Ratio* ((R-L)/E) es van calcular a partir dels valors de consum d'oxigen mitocondrial obtinguts (Figura 21B). R: respiració en rutina, L: consum d'oxigen en inhibir l'ATP sintasa i E: respiració màxima, obtinguda en afegir el desacoblant FCCP. * indica diferències significatives respecte el grup control amb $p < 0,01$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució. **(B)** Taula amb els valors de les *Flux Control Ratios*. Els resultats són mitges \pm error estàndard de 3 experiments independents.

A.3.3) Efectes de la repressió de Mfn2 en el potencial de membrana mitocondrial

Es va mesurar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) mitjançant el marcatge amb la sonda TMRM (apartat B.2 de Materials i Mètodes) amb o sense CCCP, en miotubs C2C12 transduïts amb els adenovirus que codifiquen el miRCtrl o els miRNA específics contra la seqüència de Mfn2.

La disminució de l'expressió de Mfn2 anà acompanyada d'una caiguda significativa del 15% en el potencial de membrana mitocondrial, indicant una lleugera disfunció dels mitocondris (Figura 23).

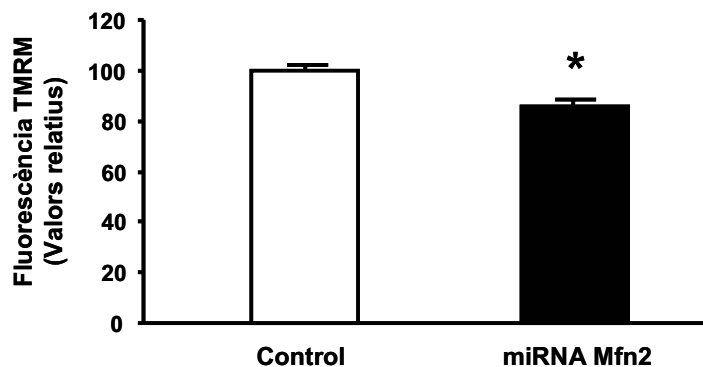


Figura 23. Efecte de la repressió de Mfn2 en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) de cèl·lules C2C12. Les cèl·lules foren incubades amb TMRM 100 nM durant 30 minuts a 37°C. Les barres mostren la mitja dels valors, i el seu error estàndard, de la resta dels nivells de fluorescència sense i amb 30 μ M de CCCP de 3 experiments independents realitzats per triplicat. S'emprà la resta dels valors de fluorescència, ja que la fluorescència perduda pel tractament amb el desacoblant CCCP és l'acumulada específicament degut al potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$). Els resultats s'expressen relatius al control. * indica diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

A.3.4) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'expressió de subunitats dels complexos de la cadena respiratòria

Per avaluar els efectes de la pèrdua de funció de Mfn2 sobre la cadena respiratòria, es va decidir analitzar l'expressió a nivell de proteïna i d'ARN missatger d'algunes subunitats dels diferents complexos que en formen part.

S'obtingueren fraccions enriquides en mitocondris i, mitjançant *Western Blot*, es van analitzar els nivells de les subunitats Ndufa9, SdhA, Uqcrc2, CoxIV i Atp5a1 dels complexos I, II, III, IV i V, respectivament. No s'observaren diferències en l'expressió de cap de les subunitats analitzades entre miotubs control i miotubs transduïts amb Adv-miRNAMfn2 (Figures 24A i 24B). La quantificació dels nivells d'ARN missatger d'aquestes mateixes subunitats per *real-time PCR* tampoc mostrà diferències significatives entre els dos grups (Figura 24C).

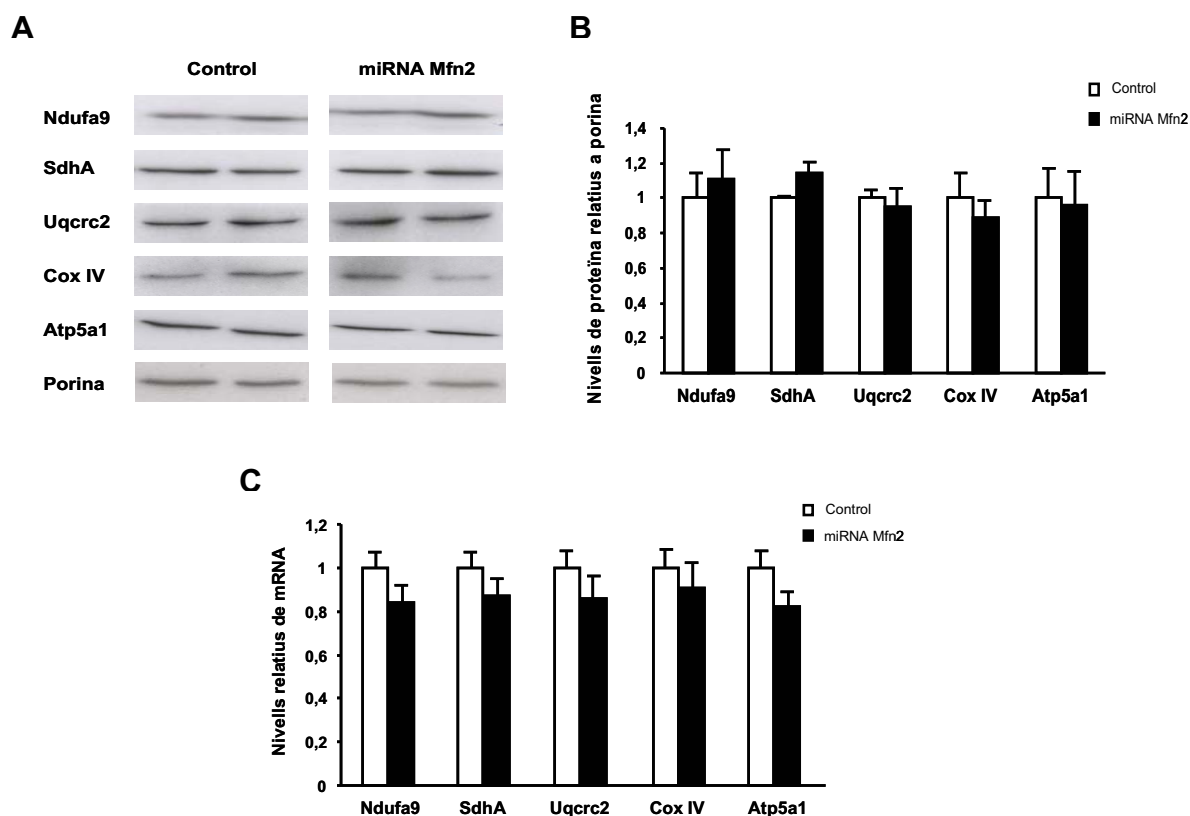


Figura 24. Efecte de la repressió de Mfn2 sobre l'expressió dels complexos de la cadena respiratòria en miotubs C2C12. (A) Anàlisi per *Western blot* de les subunitats Ndufa9 (complex I), SdhA (complex II), Uqcrc2 (complex III), CoxIV (complex IV) i Atp5a1 (complex V) en fraccions mitocondrials de miotubs control i miotubs transduïts amb Adv-miRNAMfn2 (40µg de proteïna). (B) Quantificació per densitometria de les subunitats dels complexos. Els resultats provenen de 3 experiments independents. Es mostra la mitja i el seu error estàndard dels nivells de cada proteïna relatiu a l'expressió de la proteïna mitocondrial porina. (C) *Real-time* PCR de les subunitats dels complexos. Les barres mostren la mitja, i el seu error estàndard, dels nivells de cada gen relatiu als de β -actina, gen utilitzat com a *housekeeping*.

B) ESTUDI DELS EFECTES DE L'EXPRESSIÓ DE LA FORMA TRUNCADA hMfn2 Δ 614-757 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC

A partir dels resultats observats en sobreexpressar la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en el model cel·lular C2C12 (mostrats en l'apartat A.2), i de resultats previs obtinguts en altres models cel·lulars (Pich *et al.*, 2005), ens vam plantejar estudiar els efectes de la sobreexpressió d'aquesta forma directament en múscul esquelètic de ratolí, per comprovar si en un model animal es produïen els mateixos efectes sobre el metabolisme mitocondrial. Per fer-ho vàrem generar un model murí d'expressió transitòria de la forma hMfn2 Δ 614-757 mitjançant electrotransferència d'ADN.

B.1) DESCRIPCIÓ I VALIDACIÓ DEL MODEL UTILITZAT

B.1.1) Optimització de la tècnica d'electrotransferència d'ADN

El mètode escollit per l'estudi de l'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 *in vivo* va ser l'electrotransferència d'ADN a múscul esquelètic, tècnica que permet una expressió elevada i prolongada en el temps del gen d'interès (Aihara *et al.*, 1998; Mir *et al.*, 1999). Aquesta metodologia s'explica detalladament a l'apartat C.1 de Materials i Mètodes.

L'eficiència de l'electroporació ve determinada pel grau de permeabilització de la membrana plasmàtica, que dependrà de diferents factors, com la intensitat i freqüència del camp elèctric, el número de polsos aplicats i la duració dels mateixos, la composició de la solució d'ADN i l'edat de l'animal. Per tant, per tal d'optimitzar la tècnica, es van realitzar una sèrie de proves prèvies utilitzant un vector que codifica la proteïna GFP. En un d'aquests experiments es determinà en quin tipus de múscul l'eficiència de l'electrotransferència era major. Es van electroporar els tibialis anterior, gastrocnemi i quàdriceps de 2 ratolins de la soca C57BL/6J amb aquest vector, aplicant un camp elèctric de 175 V/cm i 1 Hz de freqüència, amb 10 polsos de 20 mil·lisegons cada un. Al cap de dues setmanes els ratolins van ser sacrificats i els músculs mencionats s'observaren a la lupa de fluorescència (Figura 25). L'eficiència de l'electrotransferència fou més elevada en el tibialis anterior, el múscul més petit dels electroporats, on es pot veure una distribució homogènia de l'expressió de la proteïna

GFP al llarg de les fibres. En el gastrocnemi també s'assoliren bons nivells d'expressió de GFP tot i que més localitzada en la zona d'injecció del plàsmid. En el cas del quàdriceps l'eficiència de l'electrotransferència fou més baixa, amb l'expressió de GFP limitada a la part més superficial del múscul. Tenint en compte aquestes diferències en l'eficiència de l'electrotransferència d'ADN segons el tipus de múscul, els experiments *ex vivo* (respirometria, activitats dels complexos de la cadena respiratòria...) es varen realitzar amb tibialis anterior o gastrocnemi, descartant el quàdriceps per aquests assajos.

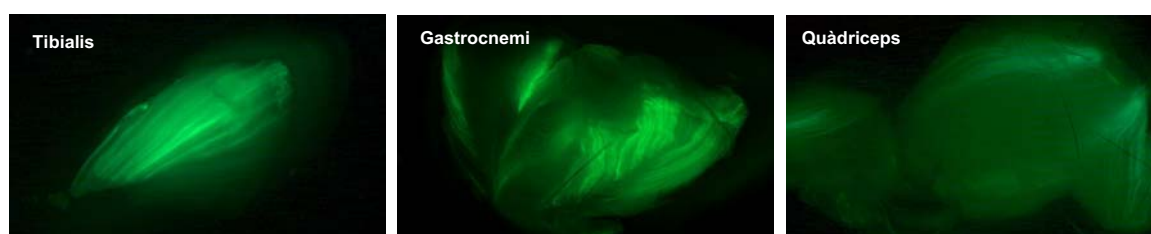


Figura 25. Eficiència de l'electrotransferència d'ADN en funció del tipus de múscul. Imatges obtingudes a la lupa de fluorescència dels músculs tibialis anterior, gastrocnemi i quàdriceps 15 dies després de ser electroporats amb un vector que codifica la proteïna GFP.

B.1.2) Generació i validació del model d'expressió transitòria de la forma hMfn2 Δ 614-757 en múscul esquelètic

Un cop optimitzada la tècnica de l'electrotransferència d'ADN, vam procedir a la generació del model d'expressió transitòria de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757. Es varen utilitzar ratolins mascles de la soca C57BL/6J, d'entre 8 i 10 setmanes d'edat, que foren electroporats amb el constructe pSP-CMVSV40-hMfn2 Δ 614-757 o amb el vector buit com a control (veure apartat C.1.1.1 de Materials i Mètodes). De cada ratolí s'electroporaren els dos tibialis anteriors (60 μ g de plàsmid a cada un), els dos gastrocnemis i els dos quàdriceps (100 μ g de plàsmid per múscul). Al cap de dues setmanes de l'electroporació els ratolins van ser sacrificats i es van extreure els músculs per tal d'obtenir-ne homogenats totals i comprovar l'expressió de Mfn2 per *Western Blot*. Com es pot observar a la figura 26A, es detectà una banda d'uns 75kDa que correspon a la hMfn2 Δ 614-757, no present als ratolins electroporats amb el vector buit. En aquestes condicions, no s'observaren canvis en l'expressió de Mfn2 endògena ni en la quantitat de la proteïna mitocondrial porina (Figura 26B), emprada com a control de càrrega i com a marcador de la quantitat de mitocondris d'una mostra. Cal destacar que

els nivells d'expressió de la forma truncada de Mfn2 humana en múscul esquelètic són molt més baixos que els obtinguts en models cel·lulars, ja que la sobreexpressió només és de 2 a 4 cops més gran que l'expressió de la Mfn2 endògena.

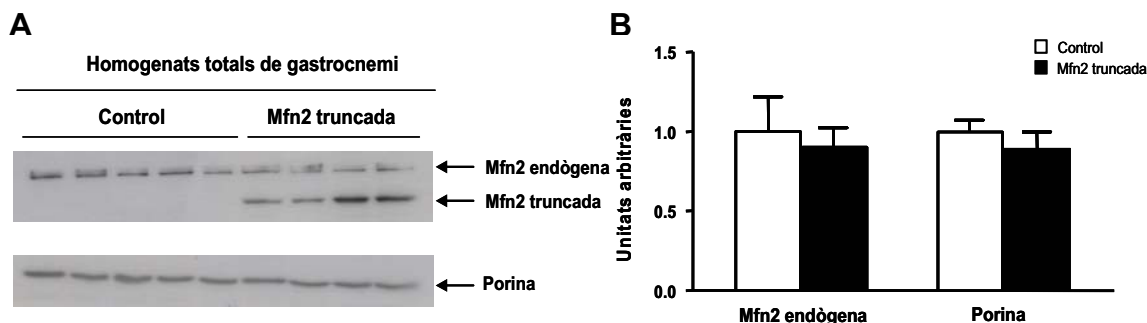


Figura 26. Expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en múscul esquelètic de ratolí. (A) Anàlisi per *Western Blot* de 40 μ g de proteïna provinents d'homogenats totals de gastrocnemi de ratolins control i ratolins que expressen la forma truncada de Mfn2. **(B)** Quantificació per densitometria de l'expressió de Mfn2 endògena i de porina. El gràfic mostra la mitja i l'error estàndard corresponent a 3 experiments independents.

Una vegada comprovada la validesa del mètode de l'electrotransferència d'ADN per expressar la forma truncada de Mfn2 en múscul esquelètic *in vivo*, i que l'expressió de la hMfn2 Δ 614-757 es mantenia almenys al llarg de 15 dies, vàrem procedir a fenotipar aquests ratolins. Malgrat ser conscients de les limitacions d'aquest model, com l'elevada variabilitat en l'eficiència de l'electrotransferència d'ADN i per tant, de l'expressió de la proteïna d'interès, o la impossibilitat d'electroporar tots els músculs del ratolí, vam començar analitzant el fenotip global dels ratolins.

B.2) FENOTIP GENERAL DEL MODEL *IN VIVO* D'EXPRESSIÓ DE LA FORMA TRUNCADA hMfn2 Δ 614-757

En un primer moment, es van adquirir 24 ratolins mascles (8-10 setmanes d'edat) que es van dividir en 2 grups del mateix pes inicial: la mitja del pes corporal del primer grup era de 22,8 \pm 0,4 grams, mentre que la del segon grup era de 22,6 \pm 0,5 grams. Es van electroporar, en 3 sèries de 8 ratolins cadascuna, els animals del primer grup amb el vector control i els del segon grup amb el plàsmid que codifica la forma truncada de Mfn2 humana. De cada ratolí es van electroporar els músculs tibialis anterior, gastrocnemi i quàdriceps.

Una setmana després, i amb els ratolins totalment recuperats del procés d'electroporació, se'ls realitzà un test de tolerància intraperitoneal a la glucosa o GTT.

No s'observaren diferències significatives en el perfil d'absorció de glucosa entre els dos grups després de l'administració intraperitoneal d'un bolus de 2g glucosa / Kg pes corporal (Figura 27).

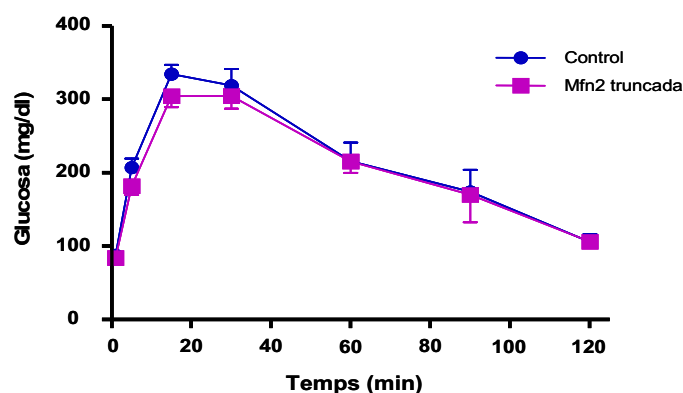


Figura 27. Test de tolerància intraperitoneal a la glucosa (GTT) del model *in vivo* d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757. Els animals van ser alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard. Al cap d'una setmana de l'electrotransferència i després d'un dejuni de 16h, s'efectuà una injecció intraperitoneal de glucosa (2g/kg) i es mesurà la glucèmia, mitjançant un petit tall a la cua, amb un glucòmetre al cap de 5, 15, 30, 60, 90 i 120 minuts. El gràfic representa la mitja i el seu error estàndard de n = 12 controls i n = 10 ratolins que expressen Mfn2 truncada. Es va realitzar un test ANOVA de 2 factors per comparar les 2 corbes i una prova t Student amb dues cues de distribució en cada temps i no es trobaren diferències significatives en cap dels casos.

També es va obtenir sang 5, 15, 30 i 60 minuts després de l'administració intraperitoneal de glucosa i posteriorment es va determinar la concentració d'insulina en plasma. No s'observaren diferències significatives entre els ratolins control i els ratolins que expressen la forma truncada de Mfn2 humana (Figura 28).

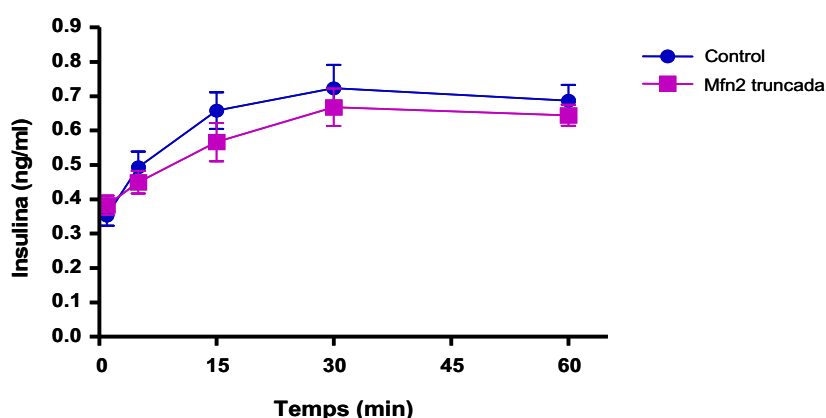


Figura 28. Nivells d'insulina durant el GTT en el model *in vivo* d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757. La sang extreta als minuts 5, 15, 30 i 60 del GTT va ser centrifugada per obtenir plasma, on es va mesurar la concentració d'insulina. El gràfic representa la mitja i el seu error estàndard de n = 12 controls i n = 10 ratolins que expressen Mfn2 truncada. Es va realitzar un test ANOVA de 2 factors per comparar les 2 corbes i una prova t Student amb dues cues de distribució en cada temps i no es trobaren diferències significatives en cap dels casos.

Tampoc es va observar cap diferència entre els dos grups d'animals en els nivells circulants de glucosa o en els d'insulina, ni en situació de dejuni ni en condicions d'alimentació (Figura 29).

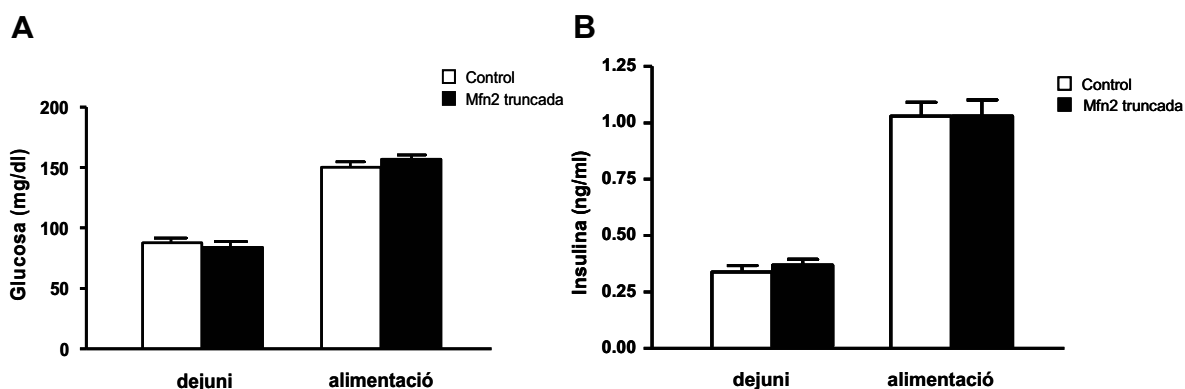


Figura 29. Nivells de glucosa i d'insulina circulants en el model *in vivo* d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757. Ratolins C57Bl6/J mascles foren electroporats amb el vector buit o amb el vector que codifica la forma truncada de Mfn2 humana i alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard. Al cap d'una setmana es mesurà la glucèmia (A) i la insulinèmia (B) en condicions d'alimentació o després d'un dejuni de 16 hores. Es mostra la mitja, i el seu error estàndard, de 10-12 ratolins per grup. Es va realitzar una prova t Student amb dues cues de distribució i no es trobaren diferències significatives en cap dels casos.

Per estudiar possibles diferències en el pes lligades a la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757, els ratolins van ser sacrificats al cap de dues setmanes de ser sotmesos a l'electrotransferència d'ADN. Al llarg d'aquests 15 dies, els ratolins que expressen la forma truncada de Mfn2 humana presentaren un menor increment de pes que els ratolins control, tot i que aquesta tendència no va ser estadísticament significativa (Figura 30).

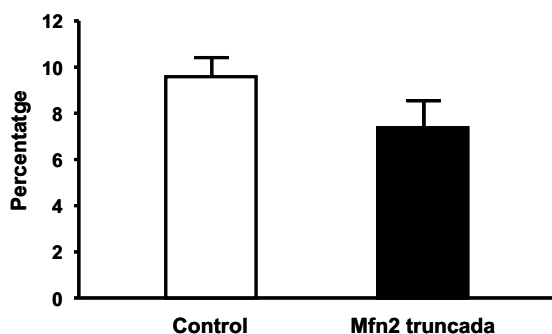


Figura 30. Increment de pes en el model *in vivo* d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757. Els ratolins foren pesats abans de ser electroporats i 15 dies després, abans de ser sacrificats. El gràfic mostra el percentatge de l'increment de pes en 2 setmanes respecte el pes inicial. Les barres mostren la mitja i el seu error estàndard de 10-12 animals per grup. Es realitzà una prova t Student amb dues cues de distribució i no s'obtingueren diferències estadísticament significatives ($p = 0,1$).

Un cop sacrificats, es van extreure els diferents músculs electroporats (tibialis anterior, gastrocnemi i quàdriceps) i altres teixits importants a nivell metabòlic com el

fetge, el teixit adipós epididimal (TAE) i el cor. No s'observaren diferències en el pes de cap d'aquests teixits entre els ratolins control i els ratolins que expressen la hMfn2 Δ 614-757 (Figura 31).

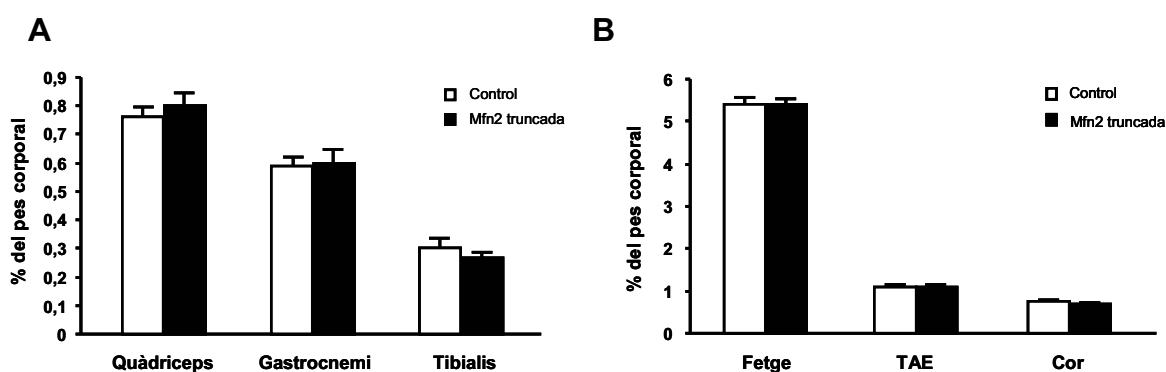


Figura 31. Pes de diferents teixits respecte al pes corporal en el model *in vivo* d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757. Els músculs electroporats (A); i el fetge, el teixit adipós epididimal (TAE) i el cor (B) s'extragueren i es pesaren 15 dies després de l'electrotransferència d'ADN. Els gràfics mostren el pes de cada teixit com a percentatge del pes corporal i representen la mitja, i el seu error estàndard, de 10-12 animals per grup.

B.3) FENOTIP A NIVELL DE MÚSCUL ESQUELÈTIC DEL MODEL *IN VIVO* D'EXPRESSIÓ DE LA FORMA TRUNCADA hMfn2 Δ 614-757

Com ja hem mencionat, el model d'expressió transitòria de la forma truncada de Mfn2 presenta una sèrie de limitacions, com la variabilitat en l'eficiència de l'electrotransferència d'ADN i per tant, de l'expressió de la proteïna d'interès i la impossibilitat d'electroporar tots els músculs del ratolí. Aquestes limitacions fan molt complicat veure un fenotip a nivell global. Així doncs, ens vam proposar estudiar els efectes de l'expressió d'aquesta forma de Mfn2 directament en els músculs electroporats.

B.3.1) Efectes de l'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en l'abundància i la morfologia mitocondrial

En primer lloc vam voler comprovar si l'expressió de la hMfn2 Δ 614-757 alterava la quantitat de mitocondris de les fibres musculars. El mètode que vam utilitzar per estimar el número de mitocondris dels músculs electroporats fou la quantificació de l'ADN mitocondrial (mtDNA). Es tracta d'un mètode de quantificació relativa, en què es calcula el número de còpies d'ADN mitocondrial respecte el contingut d'ADN nuclear (nDNA) mitjançant *real-time* PCR (apartat G.5 de Materials i Mètodes).

S'obtingué ADN total a partir de gastrocnemis de ratolins electroporats amb el vector control o amb el vector que codifica la forma truncada de Mfn2 humana. Utilitzant encebadors específics, s'amplificaren els gens *Cox2* (subunitat II del complex IV) i *SdhA* (subunitat A del complex II), codificats pel genoma mitocondrial i el nuclear, respectivament. Com es pot veure a la figura 32, no s'observaren diferències significatives en la ratio mtDNA / nDNA, indicant que l'expressió de la hMfn2 Δ 614-757 en múscul esquelètic no modifica la quantitat de mitocondris.

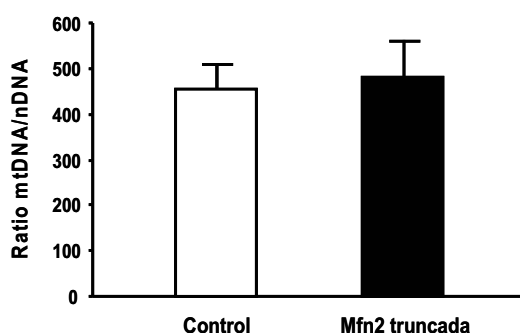


Figura 32. Quantificació de l'ADN mitocondrial mitjançant *real-time* PCR en el model *in vivo* d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757. Es va obtenir ADN total de gastrocnemis de ratolins control i ratolins electroporats amb la forma truncada de Mfn2 dues setmanes després de l'electroporació. Mitjançant *real-time* PCR s'amplificà el gen mitocondrial *Cox2* i el gen nuclear *SdhA* amb encebadors específics. El gràfic mostra la mitja, i el seu error estàndard, dels nivells del gen mitocondrial relatius als del gen nuclear, utilitzat com a *housekeeping*. N = 6 animals per grup.

També vam voler comprovar si l'expressió de la hMfn2 Δ 614-757 tenia algun efecte en la morfologia i estructura dels mitocondris de les fibres musculars. Amb aquesta finalitat, es va decidir analitzar els tibialis de ratolins control i de ratolins electroporats amb la forma truncada de Mfn2 per microscopia electrònica de transmissió (Figura 33). No s'observaren diferències en la morfologia mitocondrial entre els dos grups. Tampoc s'observaren diferències en la quantitat de mitocondris, com ja havíem observat amb la quantificació de l'ADN mitocondrial, ni en la distribució dels mitocondris en la fibra muscular.

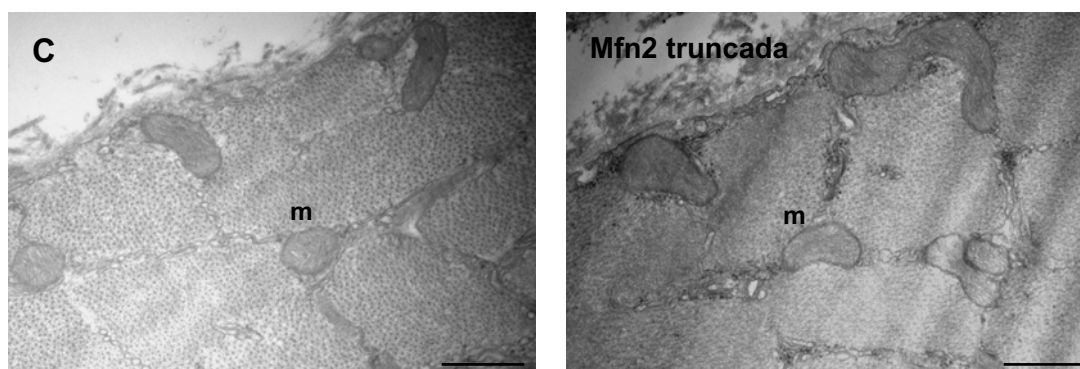


Figura 33. Anàlisi per microscopia electrònica de transmissió de tibialis anterior provinents del model *in vivo* d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757. Imatges representatives de seccions transversals de tibialis de ratolins electroporats amb el vector control (C) i de ratolins electroporats amb la forma truncada de Mfn2. m: mitocondri; barra d'escala: 0,5 μ m.

B.3.2) Efectes de l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en l'oxidació de glucosa

Un cop demostrat que l'expressió de la forma truncada de Mfn2 humana en múscul esquelètic de ratolí no produïa cap canvi a nivell de quantitat i morfologia dels mitocondris, ens vam proposar estudiar els seus possibles efectes metabòlics. Atès que la sobreexpressió d'aquesta forma en cèl·lules HeLa provoca un augment en l'oxidació de glucosa (Pich *et al.*, 2005), el primer experiment que ens vam plantejar va ser la mesura de l'oxidació de glucosa en múscul.

Els experiments d'oxidació de glucosa es van realitzar dues setmanes després de l'electrotransferència d'ADN. Es va escollir treballar amb el tibialis ja que l'eficiència d'electroporació és molt bona i a més, és el múscul més petit dels electroporats. Tot i així, es va haver de dividir longitudinalment en 2 parts per tal d'evitar problemes de difusió d'oxigen i de substrats. Els animals van ser sacrificats i els músculs ràpidament extrets i incubats en KRBH més 5 mM de glucosa no marcada. Es va addicionar D-[U]-¹⁴Cglucosa (1 μ Ci/ml) al medi d'incubació i es va mesurar el CO₂ marcat radioactivament capturat al paper de filtre (apartat E.3 de Materials i Mètodes).

Els tibialis anteriors dels ratolins control presentaren una taxa d'oxidació de glucosa de $92,7 \pm 13,1$ nmol / h·g de teixit, mentre que en el cas de la sobreexpressió de la Mfn2 truncada l'oxidació fou de $143,5 \pm 18,1$ nmol / h·g de teixit. Aquestes diferències entre els dos grups foren estadísticament significatives, amb una $p = 0,02$. Així doncs, podem concloure que l'expressió de la forma truncada de Mfn2 en múscul esquelètic estimula l'oxidació de glucosa en un 50% respecte els controls (Figura 34).

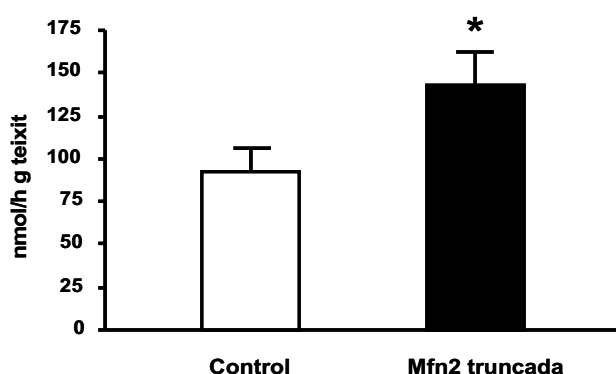


Figura 34. Efecte de l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 en l'oxidació de glucosa en múscul esquelètic. Es va determinar l'oxidació de glucosa en el múscul tibialis de ratolins control i ratolins que expressen la forma truncada de Mfn2 humana 15 dies després de l'electrotransferència d'ADN. Els resultats són mitges \pm errors estàndard de $n = 15$ tibialis per grup i s'expressen com a nmol de glucosa oxidats durant 1 h per g de teixit. * indica diferències estadísticament significatives amb $p = 0,02$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

B.3.3) Efectes de l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en la taxa de consum d'oxigen

L'increment en l'oxidació de glucosa observat en expressar la forma truncada de Mfn2 (apartat B.3.2) ens va fer pensar en la possibilitat que aquests músculs presentessin una major activitat mitocondrial. Aquest fet, juntament amb els resultats de respirometria obtinguts en el model cel·lular C2C12 (apartat A.2.1), feia interessant mesurar la taxa de consum d'oxigen en fibres musculars permeabilitzades utilitzant l'*oxygraph-2k* (OROBOROS). Aquest mètode ens proporciona una visió global del funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial, mitjançant l'addició successiva de diferents substrats i inhibidors a les cambres de l'*oxygraph-2k* (apartat E.2.2 de Materials i Mètodes).

Per aquest tipus d'experiments es van utilitzar 6 ratolins, als quals es va electroporar el tibialis esquerre amb el vector buit i el tibialis dret amb el vector que codifica la forma truncada de Mfn2 humana. L'experiment es va plantejar d'aquesta manera per minimitzar les diferències en el consum d'oxigen entre animals. Entre 10 i 12 dies després de l'electrotransferència, es sacrificaren els ratolins, s'obtingueren els tibialis i es permeabilitzaren amb saponina. Immediatament, es transferiren les fibres permeabilitzades a les cambres de l'*oxygraph-2k* i es mesurà el consum d'oxigen en diferents estats respiratoris (Figura 35).

El protocol s'inicià mesurant la respiració basal (estat 4), en presència de glutamat i malat, substrats que proporcionen NADH al complex I de la cadena respiratòria, i en absència d'ADP. S'afegí ADP a una concentració saturant (2,5 mM) per mesurar el consum d'oxigen en estat 3 amb substrats del complex I. Després s'addicionà citocrom c com a control de la integritat de la membrana mitocondrial externa, i seguidament succinat per estimar la capacitat de la fosforilació oxidativa en presència de substrats del complex I i del complex II. Posteriorment s'afegí el desacoblant FCCP, assolint així la capacitat màxima del sistema de transport electrònic amb els substrats glutamat, malat i succinat. Per últim, s'addicionà rotenona i antimicina A, inhibidors del complex I i III de la cadena respiratòria, respectivament. D'aquesta manera s'obtingué el consum d'oxigen residual o no mitocondrial, que es restà dels valors anteriors per referir-nos exclusivament a la respiració mitocondrial.

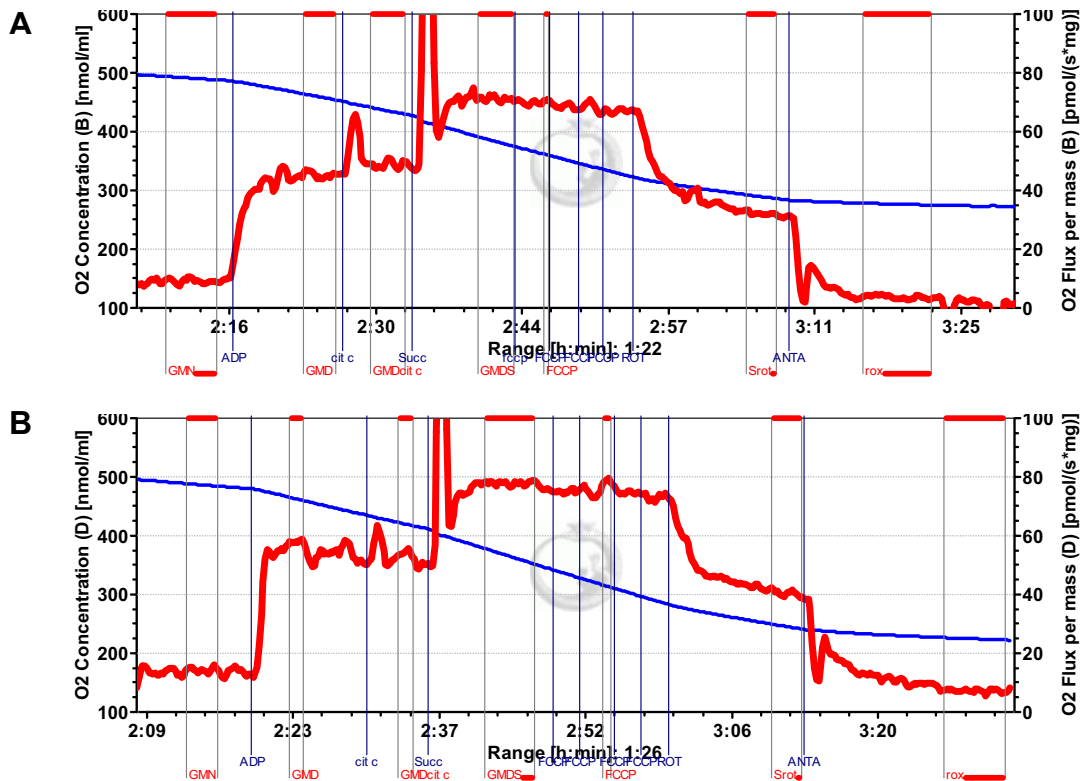


Figura 35. Mesura del consum d'oxigen en fibres musculars permeabilitzades del model *in vivo* d'expressió de la forma hMfn2Δ614-757. Resultats representatius de 6 experiments independents, amb 4 rèpliques per experiment. **(A)** Tibialis control i **(B)** Tibialis expressant la Mfn2 truncada. La línia blava és la concentració d'O₂ en nmol/ml i la línia vermella és el consum d'oxigen per mg de múscul, expressat en pmol/s·mg. Les marques verticals en color blau indiquen el moment en què s'ha afegit cada compost (en aquest ordre: ADP, citocrom c, succinat, FCCP, rotenona i antimicina A). Els intervals marcats en vermell indiquen el període estable en què s'ha mesurat el consum d'oxigen en cada un dels diferents estats respiratoris. GMN: glutamat + malat; GMD: glutamat + malat + ADP; GMDS; glutamat + malat + ADP + succinat; Srot: succinat + rotenona; rox: consum d'oxigen no mitocondrial. L'eix de les x representa el temps que dura l'experiment.

La respiració mitocondrial basal fou de $6,99 \pm 0,4$ pmol O₂ / s·mg en les fibres dels músculs control i de $5,64 \pm 0,5$ pmol O₂ / s·mg en les fibres dels músculs electroporats amb la forma truncada de Mfn2. L'addició d'ADP estimulà el consum d'oxigen fins a $42,9 \pm 2,9$ pmol O₂ / s·mg en els controls i fins a $45,4 \pm 2,1$ pmol O₂ / s·mg en el cas de l'expressió de Mfn2 truncada. En cap dels dos casos el citocrom c no incrementà la respiració, indicant que la membrana mitocondrial externa es trobava intacta i per tant, que el procés de permeabilització de les fibres no havia danyat els mitocondris. L'addició del succinat estimulà la respiració fins a $57,4 \pm 3,9$ pmol O₂ / s·mg i $59,2 \pm 3,2$ pmol O₂ / s·mg en músculs control i músculs que expressen la hMfn2Δ614-757, respectivament. En desacoblar la cadena de transport electrònic de la síntesi d'ATP amb FCCP, no s'observà cap augment en el consum d'oxigen ni en els controls ni en les músculs electroporats amb Mfn2 truncada. En inhibir el complex I amb rotenona, el

consum d'oxigen disminuï a $27,1 \pm 2,1$ pmol O₂ / s·mg en les fibres dels músculs control i a $28,4 \pm 1,0$ pmol O₂ / s·mg en les fibres dels músculs que expressen la forma truncada de Mfn2. No s'observaren diferències significatives en els nivells de consum d'oxigen mitocondrial en valors absoluts (Figura 36).

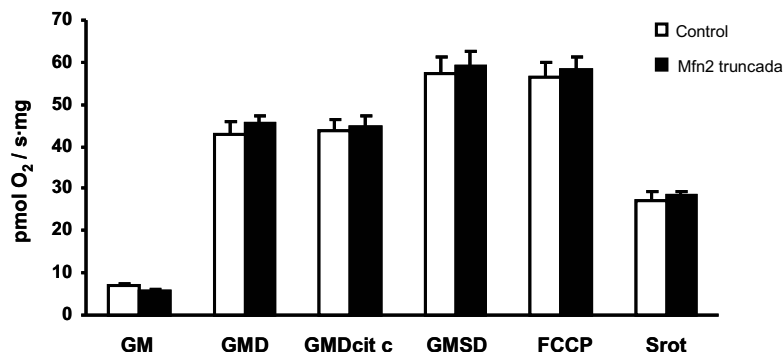


Figura 36. Efecte de l'expressió de hMfn2Δ614-757 sobre el consum d'oxigen mitocondrial en fibres musculars permeabilitzades. Mesura de la taxa de consum d'oxigen en fibres permeabilitzades en diferents estats respiratoris. El gràfic mostra la respiració mitocondrial, una vegada sostret el valor de consum d'oxigen obtingut en inhibir el complex III amb antimicina A. Els resultats són mitges ± errors estàndard de n = 6 animals i s'expressen com a pmol d'oxigen consumit per segon i per mg de teixit. GM: glutamat + malat; GMD: glutamat + malat + ADP; cit c: citocrom c; GMSD: glutamat + malat + ADP + succinat; Srot: succinat + rotenona.

A partir dels valors de consum d'oxigen mitocondrial es va calcular la *Respiratory Control Ratio* (RCR) (apartat E.2.2 de Materials i Mètodes), que ens dóna informació sobre el grau d'acoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. La RCR és el quocient entre la respiració activada per ADP (estat 3; GMD) i la respiració basal (estat 4; GM). Utilitzant glutamat i malat com a substrats, s'obtingué una RCR de $6,59 \pm 0,32$ en les fibres dels músculs control i de $7,98 \pm 0,28$ en les fibres dels músculs que expressen la forma truncada de Mfn2. Aquestes diferències foren estadísticament significatives ($p < 0,05$) (Figura 37).

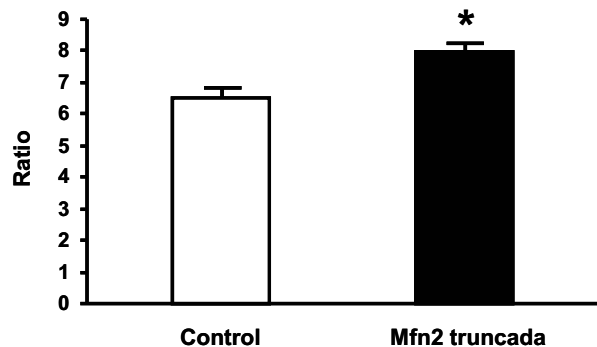


Figura 37. Mesura de la Respiratory Control Ratio (RCR). La RCR amb substrats pel complex I (glutamat i malat) es calculà com el quocient entre el consum d'oxigen amb (estat 3; GMD) i sense ADP (estat 4; GM). Els resultats són mitges ± errors estàndard de n = 6 tibialis per grup. * indica diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

Així, tot i no haver-hi diferències significatives en la capacitat respiratòria màxima (consum d'oxigen amb glutamat + malat + succinat + ADP + FCCP), les fibres dels músculs que expressen la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 presentaren un increment en la respiració estimulada per ADP respecte els músculs control.

B.3.4) Efectes de l'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria

Els resultats obtinguts en els experiments de respirometria, en què s'analitzava el funcionament global de la cadena de transport electrònic, suggerien que l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 en múscul esquelètic podia tenir efectes sobre l'activitat d'alguns complexos de la cadena respiratòria, o bé sobre la disponibilitat i accessibilitat als mitocondris de l'ADP i els diferents substrats. Per tal de discriminar entre aquests possibles efectes vam decidir estudiar l'activitat enzimàtica dels diferents complexos de la cadena respiratòria. Les activitats es van determinar espectrofotomètricament (apartat E.1 de Materials i Mètodes) en homogenats de tibialis anterior de ratolins electroporats amb el vector buit (control) o amb el vector que codifica la forma truncada de Mfn2.

En primer lloc es va determinar l'activitat enzimàtica de la citrat sintasa (CS), enzim de la matriu mitocondrial utilitzat com a marcador de la quantitat de mitocondris de la mostra. L'activitat CS fou de $373,1 \pm 29$ nmol / min·mg de proteïna en els músculs control i de $366,7 \pm 38,7$ nmol / min·mg en els músculs que expressaven la Mfn2 humana truncada (Figura 38). Això ens afirmava un cop més que l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 no altera el número de mitocondris respecte els músculs control (veure també els apartats B.1.2 i B.3.1 de Resultats).

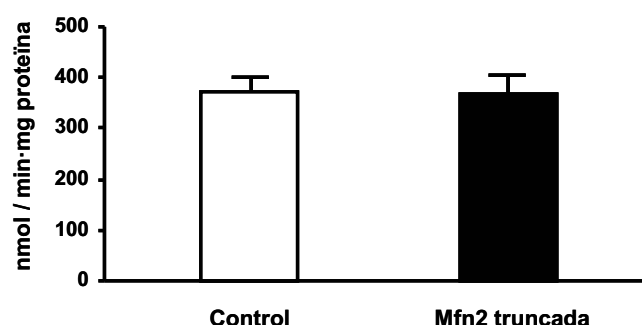


Figura 38. Activitat enzimàtica de la citrat sintasa. Es va determinar l'activitat citrat sintasa en homogenats de múscul tibialis anterior de ratolins control i ratolins que expressen la forma truncada de Mfn2 humana 15 dies després de l'electrotransferència d'ADN. Els resultats són mitges \pm errors estàndard de $n = 12$ tibialis per grup i s'expressen com a nmol / minut·mg de proteïna.

Posteriorment es determinaren les activitats de cadascun dels complexos de la cadena respiratòria per separat (apartat E.1 de Materials i Mètodes), així com també les activitats dels complexos I + III i dels complexos II + III (Figura 39). Aquestes dues activitats es mesuraren perquè la seva determinació també inclou l'activitat del coenzim Q₁₀ o ubiquinona.

L'activitat del complex III en els músculs que expressen la forma truncada de Mfn2 augmentà significativament un 20% respecte el grup control (p = 0,01). L'activitat dels complexos I + III també es veié incrementada de manera significativa en un 15% (p = 0,03). En els músculs electroporats amb el vector que codifica la forma hMfn2Δ614-757 també s'observà una tendència a l'augment en l'activitat del complex I sol, si bé aquestes diferències no foren estadísticament significatives (p = 0,07). L'expressió de Mfn2 truncada no alterà les activitats de la resta de complexos analitzats (CII, CII+III, CIV i CV).

A

Complexes	Control	Mfn2 truncada
CI	0,160 ± 0,012	0,187 ± 0,007
CII	0,060 ± 0,003	0,054 ± 0,003
CI+III	0,097 ± 0,007	0,111 ± 0,004 *
CII+III	0,028 ± 0,002	0,029 ± 0,001
CIII	0,433 ± 0,021	0,538 ± 0,034 *
CIV	1,262 ± 0,044	1,340 ± 0,069
CV	0,899 ± 0,058	0,854 ± 0,071

B

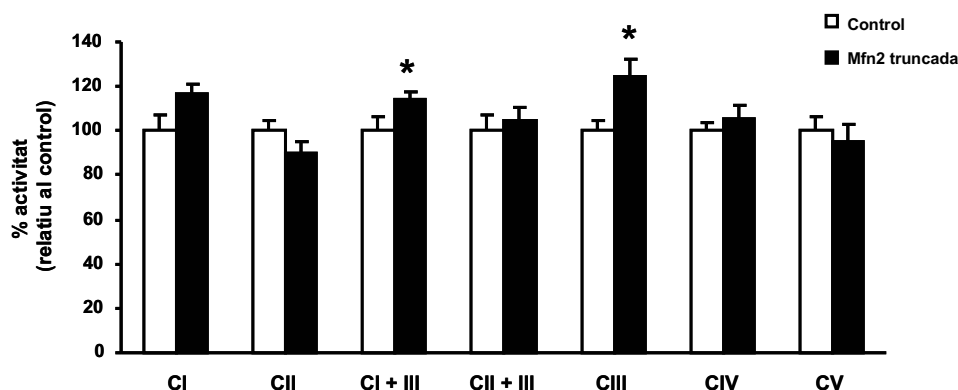


Figura 39. Efecte de l'expressió de hMfn2Δ614-757 sobre les activitats enzimàtiques dels complexos de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. Les activitats enzimàtiques dels diferents complexos es van determinar en homogenats del múscul tibialis anterior de ratolins control i ratolins que expressen la forma truncada de Mfn2 humana 15 dies després de l'electrotransferència d'ADN. **(A)** A la taula es mostra l'activitat específica de cada complex, mesurada en nmol/min·mg proteïna, i relativitzada a l'activitat específica de la citrat sintasa. Les dades són les mitges ± error estàndard de n = 7-12 músculs per grup. **(B)** El gràfic mostra els mateixos resultats representats en el panell A però expressats com a percentatge d'activitat relativa al grup control. * indica diferències estadísticament significatives amb p < 0,05 d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

B.3.5) Efectes de l'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en l'expressió de subunitats dels complexos de la cadena respiratòria

Per comprovar si l'augment en les activitats del complex III i dels complexos I+III observat en el múscul dels ratolins que expressen hMfn2 Δ 614-757 era degut a una major expressió d'aquests complexos, es va decidir analitzar, mitjançant *Western Blot* i *real-time PCR*, els nivells d'algunes de les subunitats dels complexos de la cadena de transport electrònic (Figures 40 i 41, respectivament). Referit als nivells d'expressió proteica, sorprenentment, no s'observaren diferències en l'expressió de les subunitats del complex I (Ndufa9) ni del complex III (Uqcrc2) analitzades, però en canvi es detectà un increment estadísticament significatiu en l'expressió de les subunitats CoxIV i Atp5a1 (complexes IV i V, respectivament).

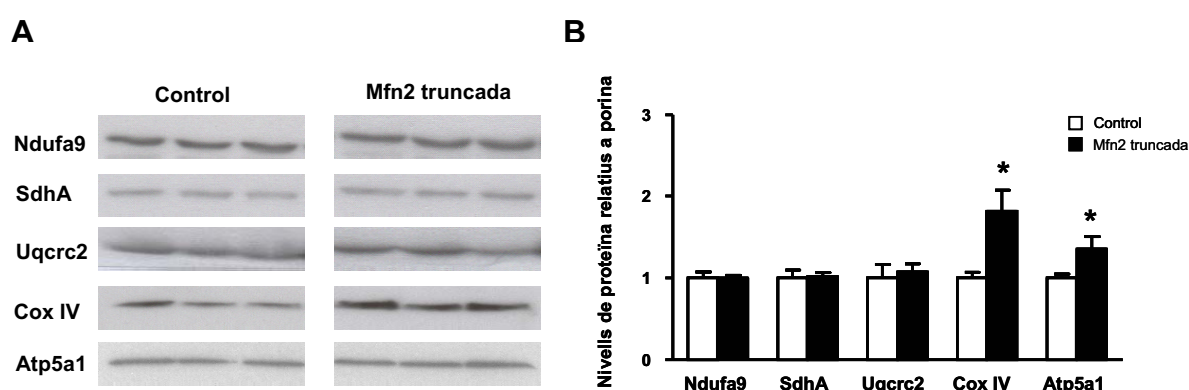


Figura 40. Efecte de l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre els nivells de proteïna dels complexos de la cadena respiratòria. (A) Anàlisi per *Western blot* de les subunitats Ndufa9 (complex I), SdhA (complex II), Uqcrc2 (complex III), CoxIV (complex IV) i Atp5a1 (complex V) en homogenats totals de gastrocnemi de ratolins electroporats amb el vector buit (control) i amb el vector que codifica la hMfn2 Δ 614-757 (40 μ g de proteïna). (B) Quantificació per densitometria de l'expressió de les subunitats dels complexos. Es mostra la mitja i el seu error estàndard dels nivells de cada proteïna relatius a l'expressió de la proteïna mitocondrial porina. N = 6 animals per grup. * indica diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

Respecte a la quantificació dels nivells d'ARN missatger d'aquestes mateixes subunitats per *real-time PCR*, no es detectaren diferències significatives en cap d'elles entre els dos grups.

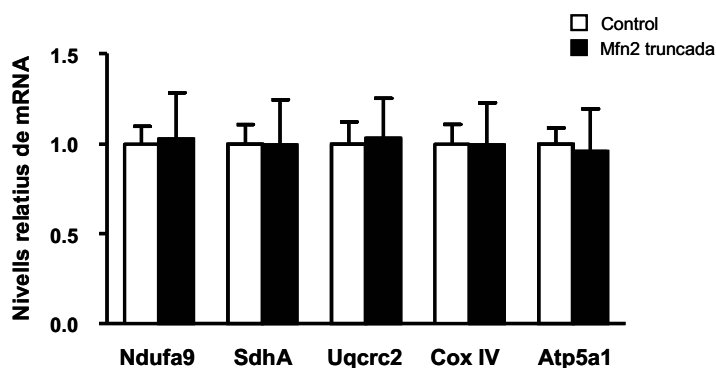


Figura 41. Efecte de l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre els nivells d'ARN missatger dels complexos de la cadena respiratòria. *Real-time* PCR de les subunitats Ndufa9 (complex I), SdhA (complex II), Uqcrc2 (complex III), CoxIV (complex IV) i Atp5a1 (complex V). Les barres mostren la mitja, i el seu error estàndard, dels nivells de cada gen relatius als de β -actina, gen utilitzat com a *housekeeping*. N = 6 animals per grup. Es realitzà una prova t Student amb dues cues de distribució però no s'observaren diferències estadísticament significatives.

B.3.6) Efectes de l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en la formació i estabilitat dels complexos i supercomplexos de la cadena respiratòria

Atès que els efectes de l'expressió de la forma truncada de Mfn2 sobre l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria no s'expliquen només per mecanismes transcripcionals, ens vam proposar analitzar l'estabilitat d'aquests complexos i la formació dels supercomplexos. Per fer-ho, vam analitzar per electroforesi en condicions natives (*Blue Native*-PAGE) fraccions mitocondrials de tibialis de ratolins electroporats amb el vector buit (control) o amb el vector que codifica la hMfn2 Δ 614-757.

En primer lloc, per optimitzar la tècnica i comprovar que érem capaços de detectar els diferents complexos i supercomplexos, es van solubilitzar 100 μ g de mitocondris de gastrocnemi de ratolins *wild-type*, sense electroporar, amb DDM (1,6 g/g de proteïna) o digitonina (4 g/g de proteïna) (apartat F.4 de Materials i Mètodes). Amb el primer detergent s'obtingué el patró característic de les cinc bandes corresponents a cadascun dels complexos de la cadena respiratòria (Figura 42) amb els següents tamanys moleculars: una banda de ~980 kDa corresponent a la forma monomèrica del CI; una banda de ~600 kDa corresponent a la forma monomèrica del CV; una banda de ~500 kDa corresponent a la forma dimèrica del CIII; una banda de ~200 kDa corresponent a la forma monomèrica del CIV i una banda de 130 kDa corresponent a la forma monomèrica del CII.

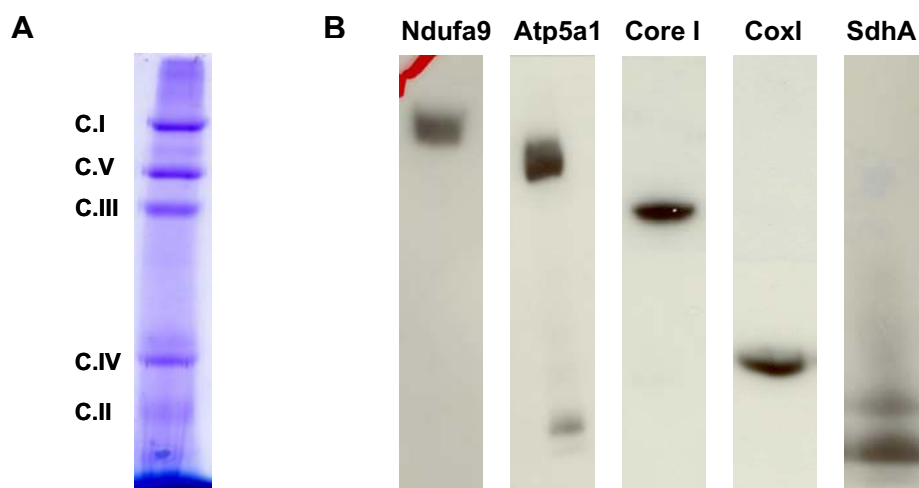


Figura 42. Blue Native PAGE de mitocondris solubilitzats amb DDM. Mitocondris de gastrocnemi de ratolins *wild-type* foren solubilitzats amb DDM (1,6 g/g de proteïna) i carregats en un gel amb un gradient lineal del 5-13% d'acrilamida. **(A)** Tinció Coomassie en què s'observa el patró de referència de les cinc bandes corresponents a la solubilització dels complexos de la cadena respiratòria (CI ~980 kDa; CV ~600 kDa; CIII ~500 kDa; CIV ~200 kDa i CII ~130 kDa). **(B)** Anàlisi WB amb anticossos contra diferents subunitats dels complexos de la cadena respiratòria: Ndufa9 (complex I), SdhA (complex II), Core I (complex III), CoxI (complex IV) i Atp5a1 (complex V).

Solubilitzant amb digitonina s'observaren, a més de les formes monomèriques dels complexos, 2 bandes d'alt pes molecular corresponents als supercomplexes I+III i I+III+IV descrits a la literatura (Figura 43) (Schagger i von Jagow, 1991; Schagger 1995; Schagger *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2003).

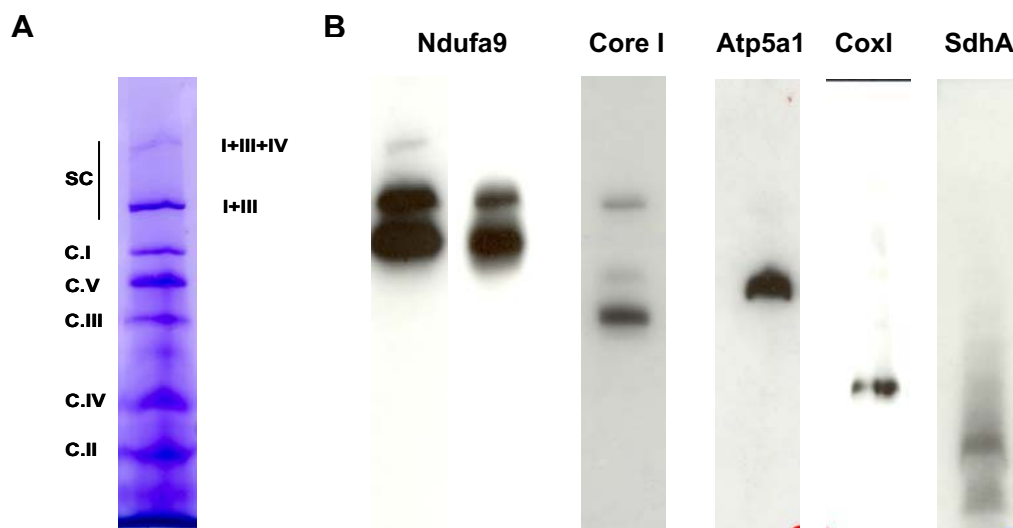


Figura 43. Blue Native PAGE de mitocondris solubilitzats amb digitonina. Mitocondris de gastrocnemi de ratolins *wild-type* foren solubilitzats amb digitonina (4 g/g de proteïna) i carregats en un gel amb un gradient lineal del 3-13% d'acrilamida. **(A)** Tinció Coomassie en què, a més de les formes monomèriques dels complexos, es detecten 2 bandes corresponents als supercomplexes I+III i I+III+IV. **(B)** Anàlisi WB amb anticossos contra diferents subunitats dels complexos de la cadena respiratòria: Ndufa9 (complex I), SdhA (complex II), Core I (complex III), CoxI (complex IV) i Atp5a1 (complex V).

És important remarcar, com s'observa en la tinció Coomassie (Figura 43A), que els complexos I i III es troben majoritàriament formant part del supercomplex I+III. Aquest fet ha estat descrit prèviament per altres grups (Acín-Pérez *et al.*, 2008; Lenaz i Genova, 2010). En canvi, això no s'observa per *Western Blot*, possiblement perquè en els supercomplexes la subunitat detectada queda menys accessible a l'anticòs corresponent. Aquesta també podria ser l'explicació per la qual, en les condicions utilitzades, el supercomplex I+III+IV només l'hem pogut detectar amb els anticossos contra les subunitats Ndufa9 i core I (complexes I i III, respectivament), però no amb l'anticòs contra la subunitat CoxI del complex IV.

Un cop comprovat que amb aquesta metodologia detectàvem el patró característic de les bandes corresponents als complexos de la cadena respiratòria, fet que indica que els mitocondris de la mostra estan en bones condicions, vam realitzar aquest tipus d'electroforesi amb les fraccions mitocondrials de tibialis de ratolins electroporats amb el vector buit (control) o amb el vector que codifica la forma hMfn2 Δ 614-757. Es van dur a terme anàlisis per *Western Blot* amb anticossos específics contra diferents subunitats dels complexos.

Solubilitzant amb digitonina, no es detectaren canvis en la quantitat de cap de les formes monomèriques dels complexos entre músculs control i músculs que expressen la forma truncada de Mfn2 (Figura 44).

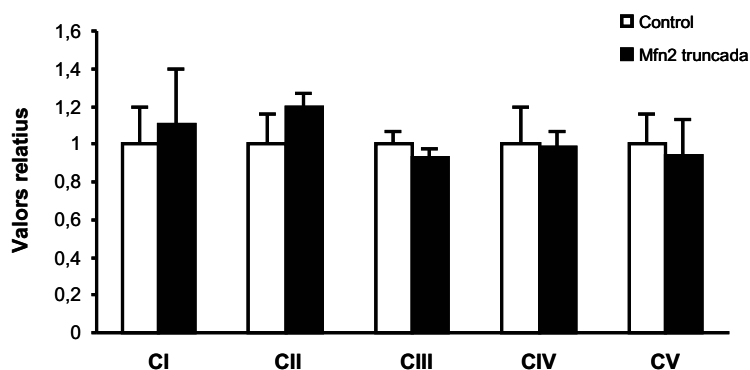


Figura 44. Quantificació dels complexos de la cadena respiratòria solubilitzats amb digitonina. Es mostra la mitja i el seu error estàndard dels nivells de cada complex. N=3 animals per grup.

En canvi, sí que s'observà, tot i no resultar estadísticament significatiu, un lleuger increment en la formació dels 2 supercomplexes detectats, especialment de la banda de més alt pes molecular (supercomplex I+III+IV) (Figures 45A i 45B). També vam calcular per densitometria la *ratio* entre els nivells dels supercomplexes i el nivell de les

formes monomèriques dels complexos que els formen. Els tibialis anterior que expressen la forma truncada de Mfn2 presentaren una major proporció del supercomplex I+III+IV en relació al monòmer del complex I (Figures 45A i 45C). Aquesta diferència fou estadísticament significativa ($p < 0,05$). La proporció del supercomplex I+III respecte el complex I també tendí a augmentar en els músculs que expressen hMfn2 Δ 614-757.

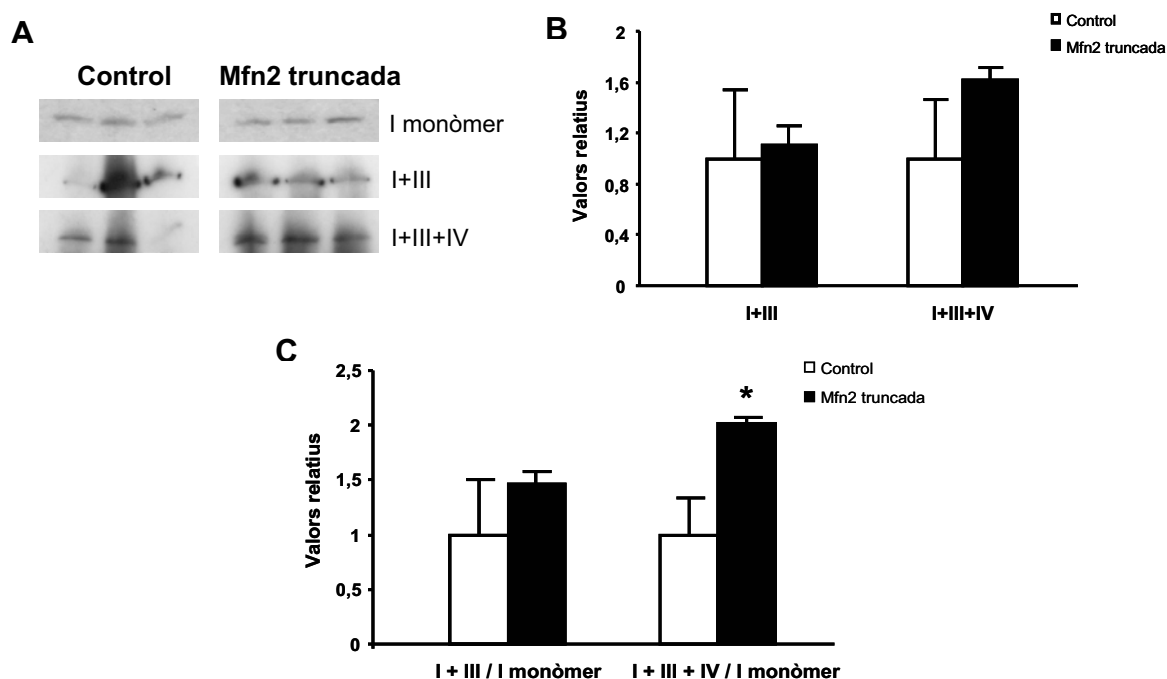


Figura 45. Detecció dels supercomplexes en assajos de BN-PAGE de fraccions mitocondrials de tibialis anterior solubilitzades amb digitonina. (A) *Western blot* amb l'anticòs contra la subunitat Ndufa9 (complex I). Es detecta el monòmer del complex I i els supercomplexes I+III i I+III+IV. **(B)** Quantificació per densitometria dels supercomplexes I+III i I+III+IV. **(C)** Relació entre els supercomplexes I+III i I+III+IV i la forma monomèrica del complex I. Es mostra la mitja i el seu error estàndard dels nivells de cada complex referit al control. N = 3 animals per grup. * indica diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

L'augment de les proporcions dels supercomplexes I+III i I+III+IV correlaciona amb l'increment de les activitats enzimàtiques dels complexos I+III i III observades (apartat B.3.4 de Resultats).

En el cas de la solubilització dels mitocondris amb DDM, que no manté els supercomplexes, no s'observaren diferències en la quantitat total dels diferents complexos entre els ratolins control i els ratolins electroporats amb el vector que codifica la forma truncada de Mfn2, exceptuant el complex III. La quantitat total de complex III es trobà disminuïda en els ratolins que expressen hMfn2 Δ 614-757 respecte els control (Figura 46). Tenint en compte que en el cas de la digitonina no veiem aquest

efecte, podria ser que la sobreexpressió de la forma truncada de Mfn2 estigués afectant la capacitat d'extracció del complex III per part del DDM.

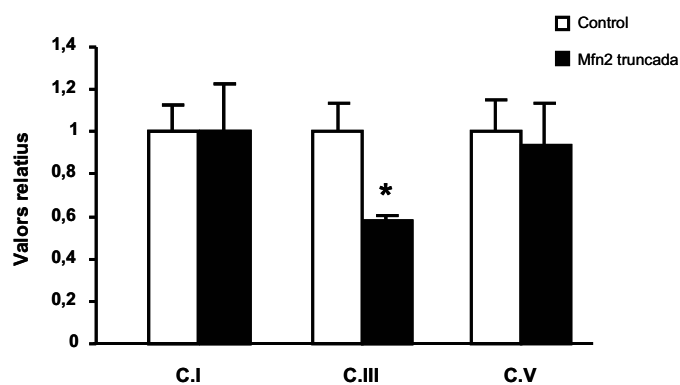


Figura 46. Quantificació dels complexos de la cadena respiratòria solubilitzats amb DDM. Es mostra la mitja i el seu error estàndard dels nivells de cada complex. N = 3 animals per grup.

C) ESTUDI DELS EFECTES DE LA REPRESSIÓ DE MITOFUSINA 2 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC

A partir dels resultats observats en reprimir l'expressió de Mfn2 en el model cel·lular C2C12 (mostrats en l'apartat A.3), i de resultats previs obtinguts en altres models cel·lulars (Pich *et al.*, 2005), ens vam plantejar estudiar els efectes de la repressió de Mfn2 sobre el metabolisme mitocondrial en múscul esquelètic *in vivo*. Amb aquest objectiu, vam generar dos models murins diferents: el model de repressió transitòria de Mfn2, obtingut mitjançant l'electrotransferència d'ADN, i el model *knockout* de Mfn2 específic de múscul esquelètic (Mfn2 KO).

C.1) GENERACIÓ I VALIDACIÓ DEL MODEL DE REPRESSIÓ TRANSITÒRIA DE MFN2 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC

La generació del model de repressió transitòria de Mfn2 en múscul esquelètic es va efectuar utilitzant la tècnica de l'electrotransferència d'ADN. Es varen utilitzar ratolins mascles de la soca C57BL/6J, d'entre 8 i 10 setmanes d'edat. Els músculs tibialis anterior i gastrocnemi de la pota dreta foren electroporats amb un vector que codifica 5 microRNAs específics contra la seqüència de Mfn2 de ratolí (apartat C.1.1 de Materials i Mètodes). Com a control, es varen electroporar els mateixos músculs de la pota esquerra amb un vector que conté 5 còpies d'un microRNA control que no reconeix cap seqüència dipositada en les bases de dades. Utilitzant l'*In Vivo Imaging System* o IVIS es va comprovar que els microRNAs s'expressaven fins almenys 15 dies després de l'electrotransferència d'ADN (apartat C.1.3 de Materials i Mètodes) (Figura 47).

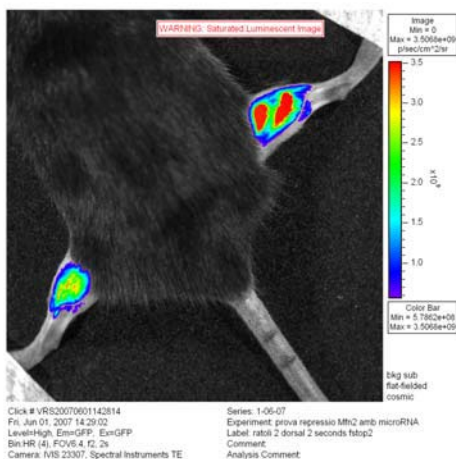


Figura 47. Comprovació de l'expressió dels miRNA. Mitjançant l'IVIS es van obtenir imatges dels ratolins 3, 5, 8, 10 i 15 dies després de l'electrotransferència d'ADN. La figura mostra una imatge representativa de n=3 animals a dia 15. El codi de colors indica la intensitat de la fluorescència detectada (de vermell a violeta, de més a menys intensitat).

Al cap de 15 dies de l'electroporació els ratolins van ser sacrificats i es van extreure els músculs per tal d'obtenir-ne fraccions mitocondrials i comprovar la repressió de l'expressió de Mfn2 per *Western Blot* (Figura 48A). Aquesta repressió fou d'aproximadament el 75%, demostrant la validesa de la tècnica i del model murí emprat. Això també es va confirmar a nivell d'ARN missatger per *real-time PCR*, on es va detectar una reducció dels nivells de missatger de Mfn2 del 60% (Figura 48C). La repressió de Mfn2 en aquestes condicions no altera l'expressió de la proteïna mitocondrial porina, analitzada per *Western Blot* (Figura 48B), suggerint que la disminució de l'expressió de Mfn2 no modifica la quantitat de mitocondris de les fibres musculars.

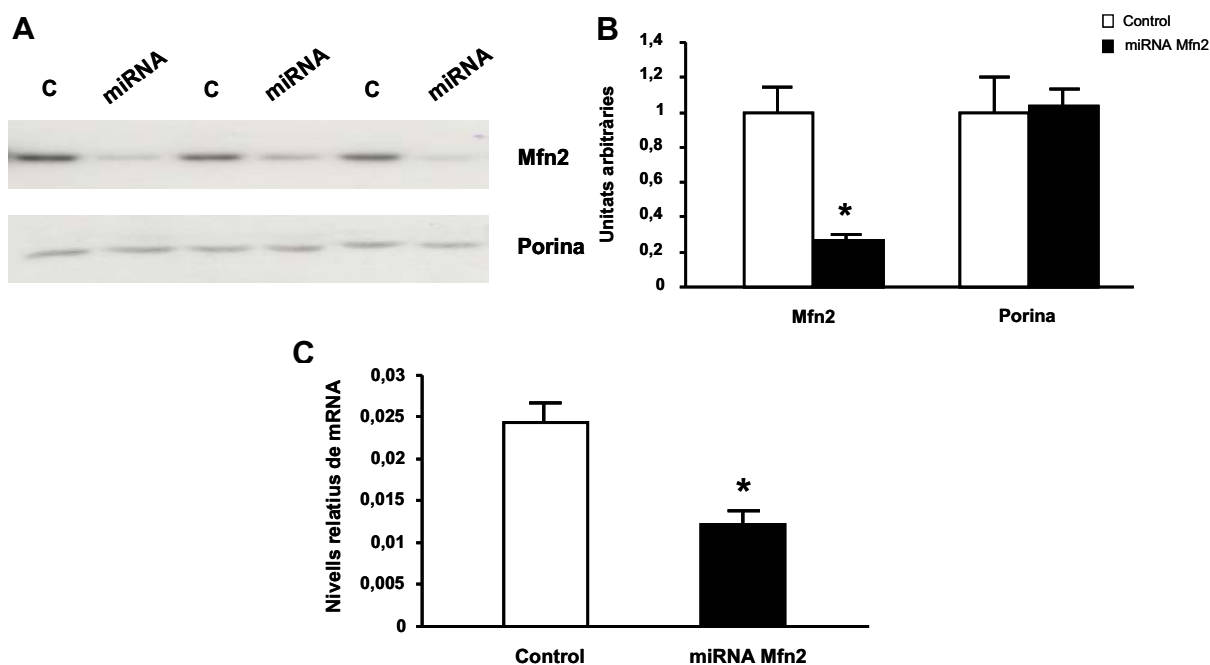


Figura 48. Repressió de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic mitjançant electrotransferència d'ADN. (A) Anàlisi per *Western Blot* de 40µg de proteïna provinents de fraccions enriquides en mitocondris de tibialis anterior electroporats amb el miRNA control (C) o amb el miRNA contra Mfn2. (B) Quantificació per densitometria de l'expressió de Mfn2 i de porina. El gràfic mostra la mitja, i el seu error estàndard, de 4 experiments independents. (C) Mesura dels nivells d'ARN missatger de Mfn2 mitjançant *real-time PCR*. El gen de la β-actina va ser emprat com a *housekeeping*. El gràfic mostra la mitja i l'error estàndard dels nivells d'expressió de Mfn2 relatius a β-actina. * indica diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

De la mateixa manera que en el cas de l'expressió de la forma truncada hMfn2Δ614-757 (apartat B.3), el model de repressió transitòria de Mfn2 generat per electrotransferència d'ADN no permet l'estudi del fenotip global dels ratolins. Així, aquest model es va utilitzar per estudiar efectes més específics en el propi múscul, com l'expressió i l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria. Amb la finalitat

d'estudiar els efectes de la repressió de Mfn2 en múscul esquelètic a nivell de tot l'organisme, vam decidir generar el model de repressió permanent de Mfn2 (Mfn2 KO).

C.2) GENERACIÓ I VALIDACIÓ DEL MODEL DE REPRESSIÓ PERMANENT DE MFN2 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC (MFN2 KO)

Per generar el model de pèrdua de funció de Mfn2 en múscul esquelètic (Mfn2 KO) es van creuar ratolins homozigots $Mfn2^{loxP/loxP}$ (Chen *et al.*, 2007) amb ratolins que expressen la Cre recombinasa sota el control d'una regió específica de múscul esquelètic del promotor de MEF2C (Heidt i Black, 2005) (apartat C.2 de Materials i Mètodes). D'aquesta manera s'obtingueren els ratolins Mfn2 KO ($mef2C-Cre^{+/-} Mfn2^{loxP/loxP}$). Com a controls s'utilitzaren els ratolins $mef2C-Cre^{-/-} Mfn2^{loxP/loxP}$, germans dels Mfn2 KO.

L'expressió de Mfn2 en diferents teixits d'aquests ratolins es va analitzar mitjançant anàlisi *Western Blot* de fraccions mitocondrials (Figura 49). Els ratolins Mfn2 KO presentaren una disminució del 80% de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic i en cor. També s'observà una reducció d'aproximadament el 50% dels nivells de Mfn2 en altres teixits com el fetge, el cervell, el teixit adipós blanc i marró i el ronyó.

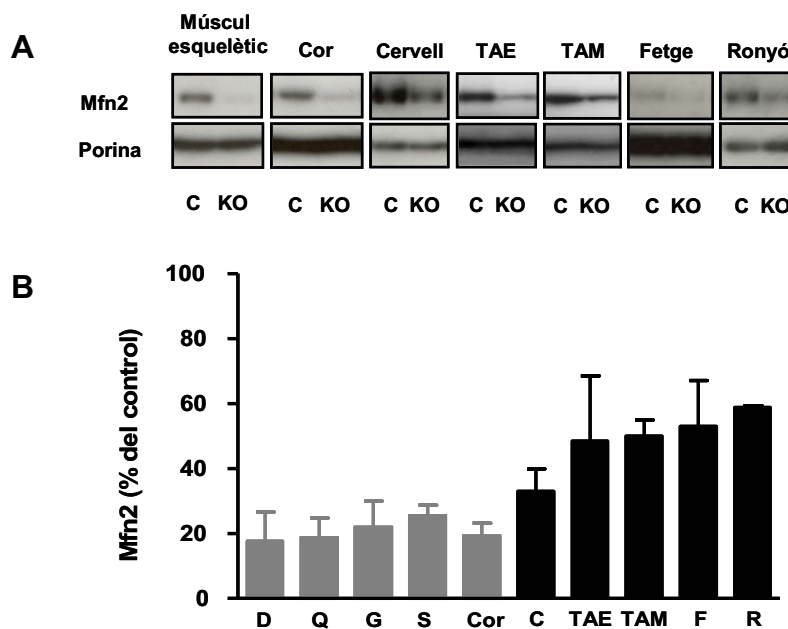


Figura 49. Expressió de Mfn2 en el model Mfn2 KO. (A) Anàlisi per *Western Blot* de 40µg de proteïna provinents de fraccions enriquides en mitocondris de diferents teixits de ratolins control (C) i ratolins Mfn2 KO. (B) Quantificació per densitometria de l'expressió de Mfn2 en diferents teixits musculars (gris) i en teixits no musculars (negre). El gràfic mostra la mitja i l'error estàndard dels nivells de Mfn2 referits a l'expressió de la proteïna mitocondrial porina i relatius al grup control. N= 3 ratolins per grup. D: diafragma; Q: quàdriceps; G: gastrocnemi; S: soleus; C: cervell; TAE: teixit adipós epididimal; TAM: teixit adipós marró; F: fetge; R: ronyó.

Els resultats obtinguts indiquen que aquest model de ratolí presenta una disminució en l'expressió de Mfn2 generalitzada en tots els teixits. La reducció de l'expressió de Mfn2 és més pronunciada en els teixits musculars (múscul esquelètic, diafragma i cor) que en els teixits que expressen baixos nivells de MEF2C endogen.

Malgrat no poder relacionar els resultats obtinguts únicament amb l'absència de Mfn2 en múscul esquelètic, vam procedir a fenotipar aquests ratolins. A més, el model ens serví per fer estudis metabòlics en múscul esquelètic *ex vivo*, com els experiments d'oxidació de glucosa i de respirometria.

C.3) FENOTIP GENERAL DEL MODEL MFN2 KO

C.3.1) Fenotip dels ratolins Mfn2 KO en condicions basals

Està descrit que l'ablació global de Mfn2 en ratolins provoca greus defectes en el moviment i l'equilibri de l'animal (Chen *et al.*, 2007). Basant-nos en aquesta observació, i en el fet que el nostre model presentava una reducció de l'expressió de Mfn2 en cervell del 50%, vàrem realitzar assajos de coordinació motora mitjançant el Rota-rod (apartat D.3 de Materials i Mètodes). No s'observà cap tipus d'alteració de la coordinació en els ratolins Mfn2 KO respecte els ratolins control (Figura 50).

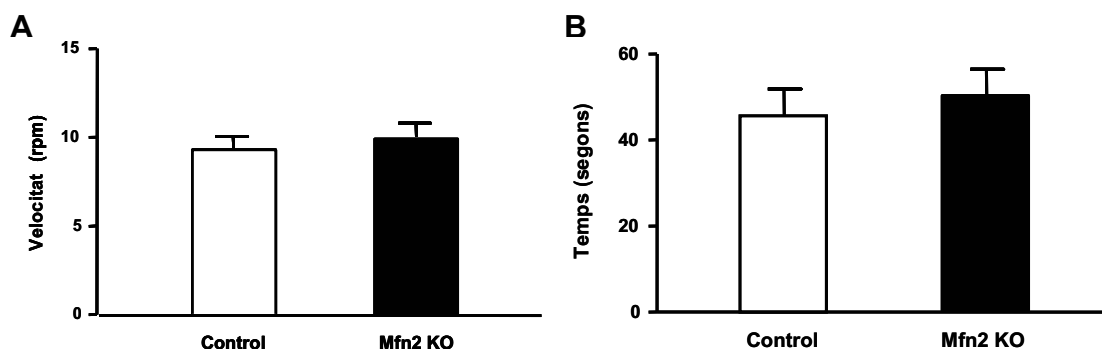


Figura 50. Assajos de coordinació motora en el model Mfn2 KO. La coordinació i l'equilibri es van analitzar en ratolins control i ratolins Mfn2 KO de 20-24 setmanes d'edat utilitzant un Rota-rod. Els ratolins es col·locaren sobre l'eix, que girava a una velocitat inicial de 4 rpm. La velocitat s'incrementà gradualment de 4 a 50 rpm en un període de 5 minuts. Es registrà (A) la velocitat exacta a la que caigueren els ratolins i (B) el temps, mesurat en segons, que s'havien mantingut sobre l'eix. El gràfic mostra la mitja, i el seu error estàndard, de n = 5 ratolins per grup.

Per fenotipar el model, es van pesar els ratolins control ($mef2C-Cre^{-/-} Mfn2^{loxP/loxP}$) i els ratolins Mfn2 KO ($mef2C-Cre^{+/-} Mfn2^{loxP/loxP}$) cada setmana fins als 6 mesos d'edat. Com es mostra a la figura 51A, no s'observaren diferències en el pes corporal entre els

dos grups. Els ratolins Mfn2 KO tampoc presentaren alteracions en el pes del teixit adipós blanc epididimal (TAE) respecte els controls (Figura 51B).

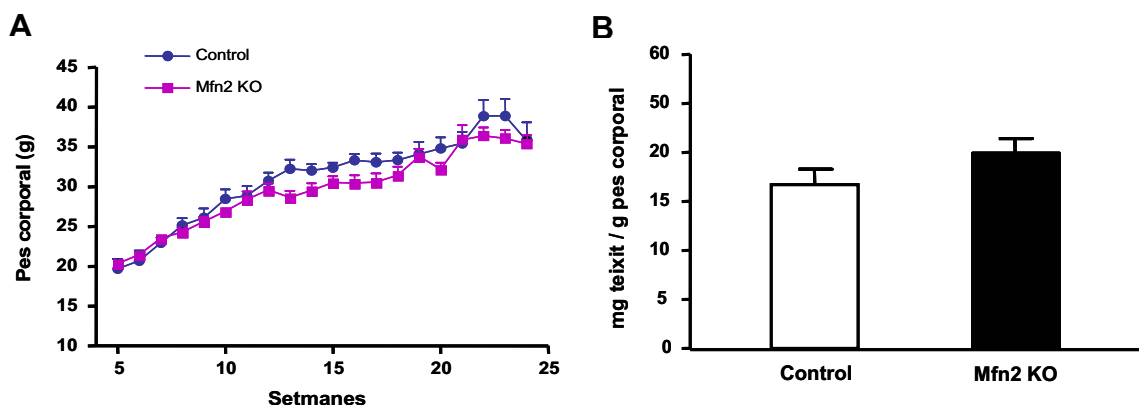


Figura 51. Pes corporal i pes del teixit adipós epididimal dels ratolins Mfn2 KO. Els ratolins es van pesar setmanalment fins a les 25 setmanes d'edat. La figura mostra la mitja del pes corporal \pm l'error estàndard d'una n=10 animals per genotip (A). Els animals van ser sacrificats a les 25 setmanes d'edat i es pesà el teixit adipós epididimal (B); els resultats s'expressen com a mg de teixit respecte el pes corporal (g).

Es realitzà un test de tolerància intraperitoneal a la glucosa o GTT a aquests ratolins als 3 mesos (resultats no mostrats) i als 6 mesos d'edat (Figura 52A). No s'observaren diferències significatives en el perfil d'absorció de glucosa entre ratolins control i ratolins Mfn2 KO després de l'administració intraperitoneal d'un bolus de 2g glucosa / kg pes corporal. També es va obtenir sang al cap de 5, 15, 30 i 60 minuts de l'administració de glucosa i es va determinar la concentració d'insulina en plasma (Figura 52B). Tampoc s'observaren diferències significatives entre els dos grups.

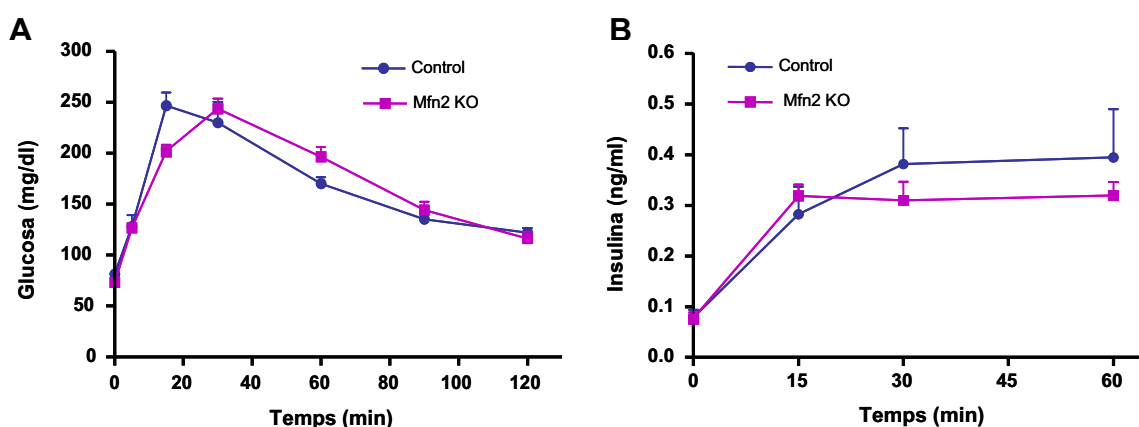


Figura 52. GTT del model Mfn2 KO. Els animals van ser alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard. Després d'un dejuni de 16h, s'efectuà una injecció intraperitoneal de glucosa (2g/kg) i es mesurà la glucèmia al cap de 5, 15, 30, 60, 90 i 120 minuts (A) La sang extreta als minuts 5, 15, 30 i 60 del GTT va ser utilitzada per mesurar la concentració d'insulina (B). Els gràfics representen la mitja, i el seu error estàndard, de n = 8-12 ratolins per grup.

Atès que en condicions basals no s'observà cap fenotip a nivell global en els ratolins Mfn2 KO, vàrem decidir sotmetre aquest model a dos tipus d'estrès diferent: per una banda l'edat i per l'altra l'alimentació amb una dieta rica en greixos.

C.3.2) Efecte de l'edat sobre el fenotip dels ratolins Mfn2 KO

No s'observaren diferències significatives en el pes corporal entre ratolins control i ratolins Mfn2 KO d'aproximadament un any d'edat (Figura 53A). Es realitzà un nou GTT a ratolins de 50 setmanes i tampoc s'apreciaren diferències en el perfil d'absorció de glucosa (Figura 53B). Tot i així, els ratolins Mfn2 KO presentaren hiperinsulinèmia en situació de dejuni, i nivells d'insulina plasmàtica superiors als controls durant el GTT (Figura 53C). Aquests resultats indiquen l'existència de resistència a la insulina en els ratolins Mfn2 KO d'un any, fet que es confirmà en realitzar un test de tolerància a la insulina (ITT). Els ratolins Mfn2 KO presentaren una resposta alterada a l'administració intraperitoneal de 0,75U d'insulina / kg pes corporal (Figura 53D).

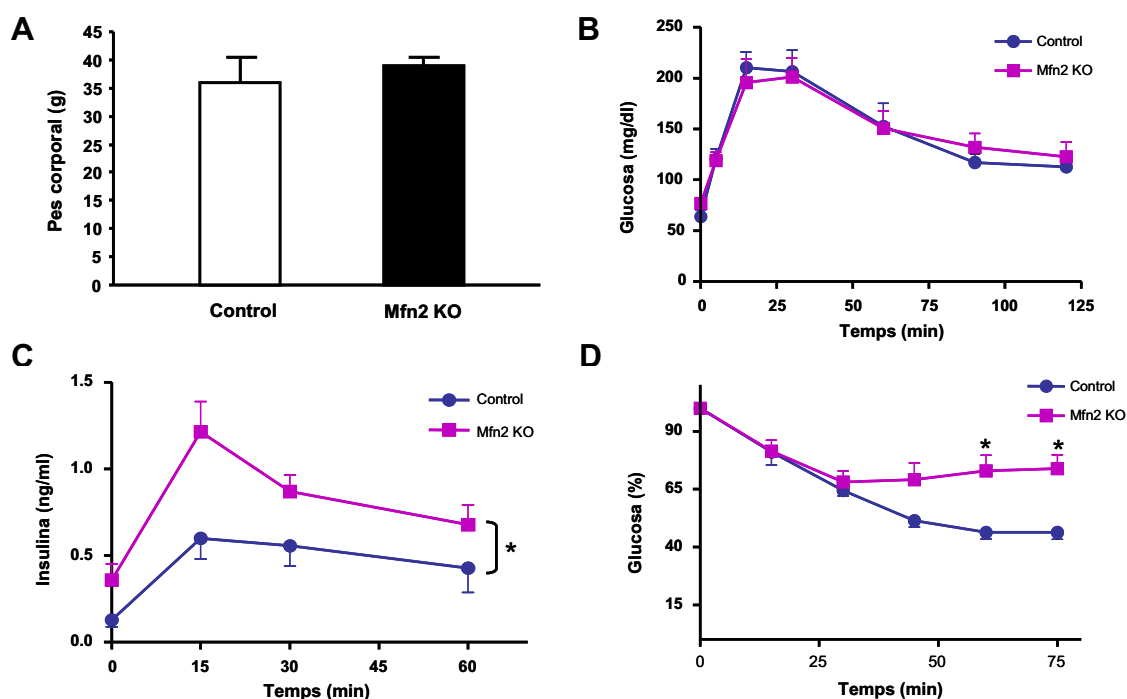


Figura 53. Efecte de l'edat en el fenotip dels ratolins Mfn2 KO. (A) Pes corporal de ratolins control i ratolins Mfn2 KO de 50 setmanes d'edat. (B) Test de tolerància intraperitoneal a la glucosa (GTT). Els animals van ser alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard. Després d'un dejuni de 16h, s'efectuà una injecció intraperitoneal de glucosa (2g/kg) i es mesurà la glucèmia al cap de 5, 15, 30, 60, 90 i 120 minuts. (C) Nivells d'insulina durant el GTT. La sang extreta als minuts 5, 15, 30 i 60 del GTT va ser utilitzada per mesurar la concentració d'insulina. * Indica diferències estadísticament significatives entre les 2 corbes d'un test ANOVA de 2 factors. (D) Test de tolerància a la insulina (ITT). Després d'un dejuni de 4h, s'efectuà una injecció intraperitoneal d'insulina (0,75U/kg) i es mesurà la glucèmia al cap de 15, 30, 45, 60 i 75 minuts. Els gràfics representen la mitja i el seu error estàndard d'una n = 8-12 ratolins per grup. * Indica diferències significatives d'una prova t Student amb dues cues de distribució als 60 i 75 minuts de l'administració d'insulina.

C.3.3) Efecte de la dieta rica en greixos sobre el fenotip dels ratolins Mfn2

KO

Ratolins control i ratolins Mfn2 KO de 10 setmanes d'edat van ser sotmesos a una dieta rica en greixos (HFD). Els ratolins Mfn2 KO mostraren la mateixa evolució en el pes corporal que el grup control, i quantitats similars de teixit adipós epididimal (Figures 54A i 54B, respectivament).

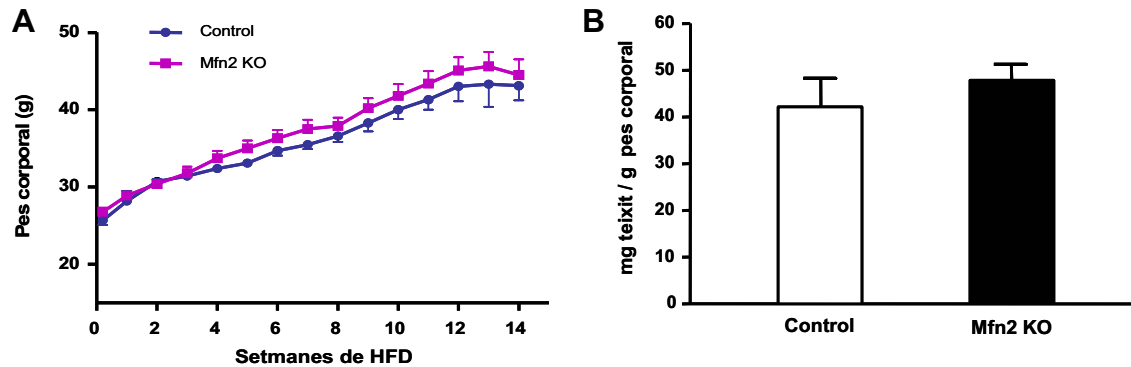


Figura 54. Pes corporal i pes del teixit adipós epididimal dels ratolins Mfn2 KO sotmesos a una dieta rica en greixos. Els ratolins es van pesar setmanalment durant les 14 setmanes que foren sotmesos a la dieta rica en greixos. La figura mostra la mitja del pes corporal \pm l'error estàndard d'una n=10 animals per genotip (A). Els animals van ser sacrificats i es pesà el teixit adipós epididimal (B); els resultats s'expressen com a mg de teixit respecte el pes corporal (g).

Després de 14 setmanes alimentats amb la dieta rica en greixos, els ratolins Mfn2 KO mostraren una disminució de la tolerància a la glucosa respecte els controls (Figura 55A), així com també nivells superiors d'insulina plasmàtica (Figura 55B). Aquest fet suggereix una major resistència a la insulina en els animals Mfn2 KO sotmesos a una dieta rica en greixos.

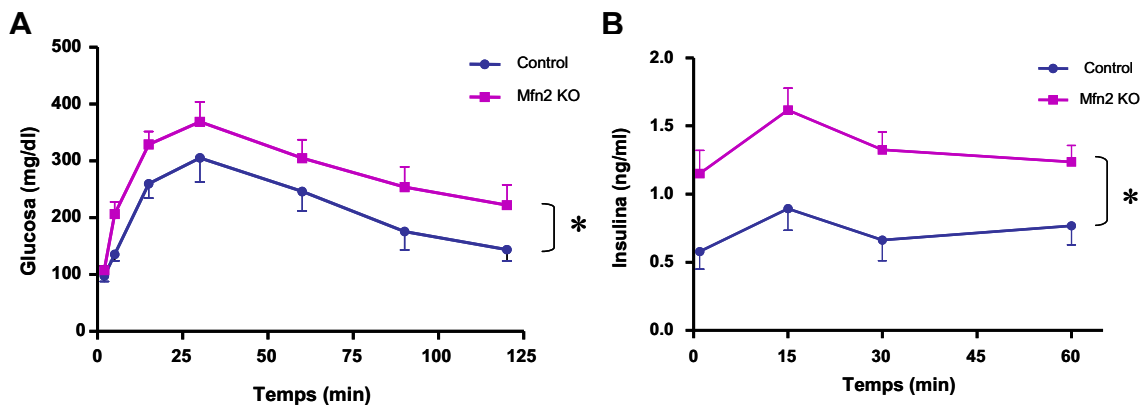


Figura 55. Test de tolerància intraperitoneal a la glucosa en ratolins Mfn2 KO sotmesos a una dieta rica en greixos. Després d'un dejuni de 16h, s'efectuà una injecció intraperitoneal de glucosa (2g/kg) i es mesurà la glucèmia al cap de 5, 15, 30, 60, 90 i 120 minuts (A). La sang extreta als minuts 5, 15, 30 i 60 del GTT va ser utilitzada per mesurar la concentració d'insulina (B). Els gràfics representen la mitja, i el seu error estàndard, de n = 8-12 ratolins per grup. * Indica diferències estadísticament significatives entre les 2 corbes d'un test ANOVA de 2 factors.

En conjunt, els resultats descrits en els apartats C.3.2 i C.3.3 indiquen que la disminució en l'expressió de Mfn2 en ratolins adults causa alteracions metabòliques associades a una major susceptibilitat a la resistència a la insulina en resposta a l'envelliment o a una dieta rica en greixos.

C.4) FENOTIP A NIVELL MUSCULAR DEL MODEL *IN VIVO* DE LA REPRESSIÓ DE MFN2

Tenint en compte que el model de Mfn2 KO no és específic de múscul, el fenotip general observat en aquests ratolins no es pot atribuir només a la disminució de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic. Així doncs, per estudiar els efectes de la repressió de Mfn2 directament sobre el múscul esquelètic, vàrem realitzar diferents assajos metabòlics *ex vivo* en el múscul.

C.4.1) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'abundància i la morfologia mitocondrial

Per comprovar si la repressió de Mfn2 alterava la quantitat de mitocondris de les fibres musculars vàrem quantificar l'ADN mitocondrial (mtDNA) mitjançant *real-time* PCR (apartat G.5 de Materials i Mètodes). Aquesta quantificació es dugué a terme pels dos models de repressió de Mfn2 emprats. En el cas del model de repressió transitòria s'utilitzaren gastrocnemis de ratolins electroporats amb el vector control o amb el vector que codifica els microRNA contra Mfn2, mentre que en el cas del ratolí Mfn2 KO la quantificació es féu a partir de quàdriceps. Utilitzant encebadors específics, s'amplificaren els gens *Cox2* (subunitat II del complex IV) i *SdhA* (subunitat A del complex II), codificats pel genoma mitocondrial i el nuclear, respectivament. No s'observaren diferències significatives en la ratio mtDNA / nDNA en cap dels dos models (Figura 56), indicant que la repressió de Mfn2 en múscul esquelètic no modifica la quantitat de mitocondris.

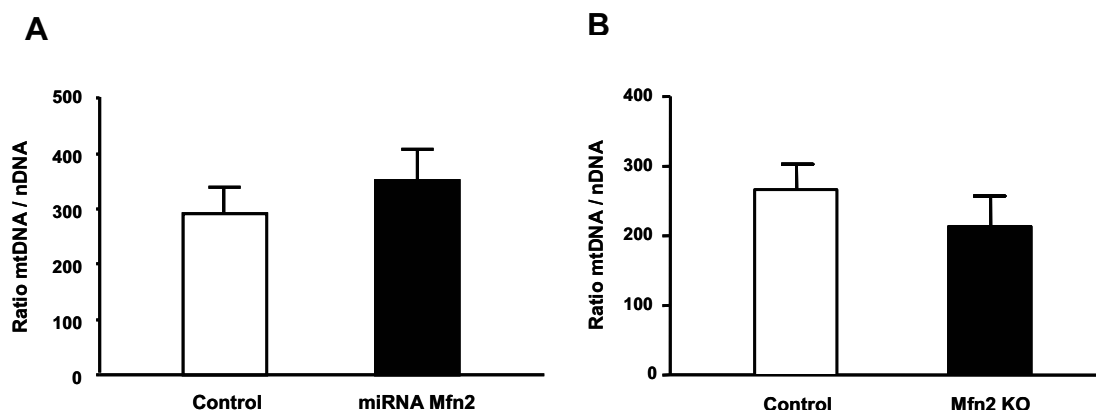


Figura 56. Quantificació de l'ADN mitocondrial mitjançant *real-time* PCR. S'obtingué ADN total de gastrocnemis electroporats amb miRNAs contra Mfn2 dues setmanes després de l'electroporació (A) i de quàdriceps de ratolins Mfn2 KO de 20 setmanes d'edat (B). Mitjançant *real time* PCR s'amplificà el gen mitocondrial *Cox2* i el gen nuclear *SdhA*. Els gràfics mostren la mitja, i el seu error estàndard, dels nivells del gen mitocondrial relatiu als del gen nuclear, utilitzat com a *housekeeping*. N = 6 animals per grup.

També vam voler comprovar si la disminució de l'expressió de Mfn2 tenia efectes en la morfologia i estructura dels mitocondris de les fibres musculars. Amb aquesta finalitat, s'obtingueren seccions longitudinals de quàdriceps de 2 ratolins control i de 2 ratolins Mfn2 KO i s'analitzaren per microscopia electrònica de transmissió (Figura 57). En animals de 6 mesos d'edat i alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard, no s'observaren diferències en la morfologia mitocondrial entre els dos grups. Tampoc s'observaren diferències en la distribució dels mitocondris en la fibra muscular.

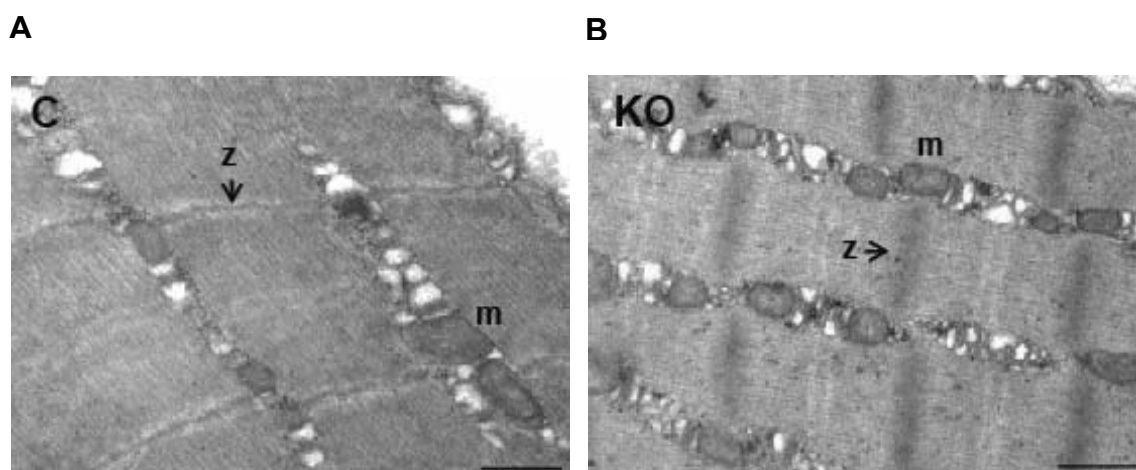


Figura 57. Anàlisi per microscopia electrònica de transmissió de quàdriceps del model Mfn2 KO. Seccions longitudinals de quàdriceps de ratolí control (A) i de ratolí Mfn2 KO (B). m: mitocondri; z: línia Z; barra d'escala: 0,5µm.

C.4.2) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'expressió d'altres proteïnes implicades en dinàmica mitocondrial

Per comprovar si la repressió de Mfn2 alterava l'expressió d'altres proteïnes de dinàmica mitocondrial com a possible mecanisme de compensació, vàrem analitzar mitjançant *Western Blot* els nivells d'expressió de les proteïnes de fusió mitocondrial Mfn1 i OPA1 (Figura 58A), i de les proteïnes de fissió Drp1 i Fis1 (Figura 58C) en homogenats totals de tibialis anterior electroporats amb el miRNA control o amb el miRNA contra Mfn2. L'expressió de Mfn1 i d'OPA1 no varià de manera significativa (Figura 58B). En canvi, l'expressió de les proteïnes de fissió mitocondrial Drp1 i Fis1 es trobà notablement disminuïda en els tibialis anterior amb l'expressió de Mfn2 reprimida (Figura 58D).

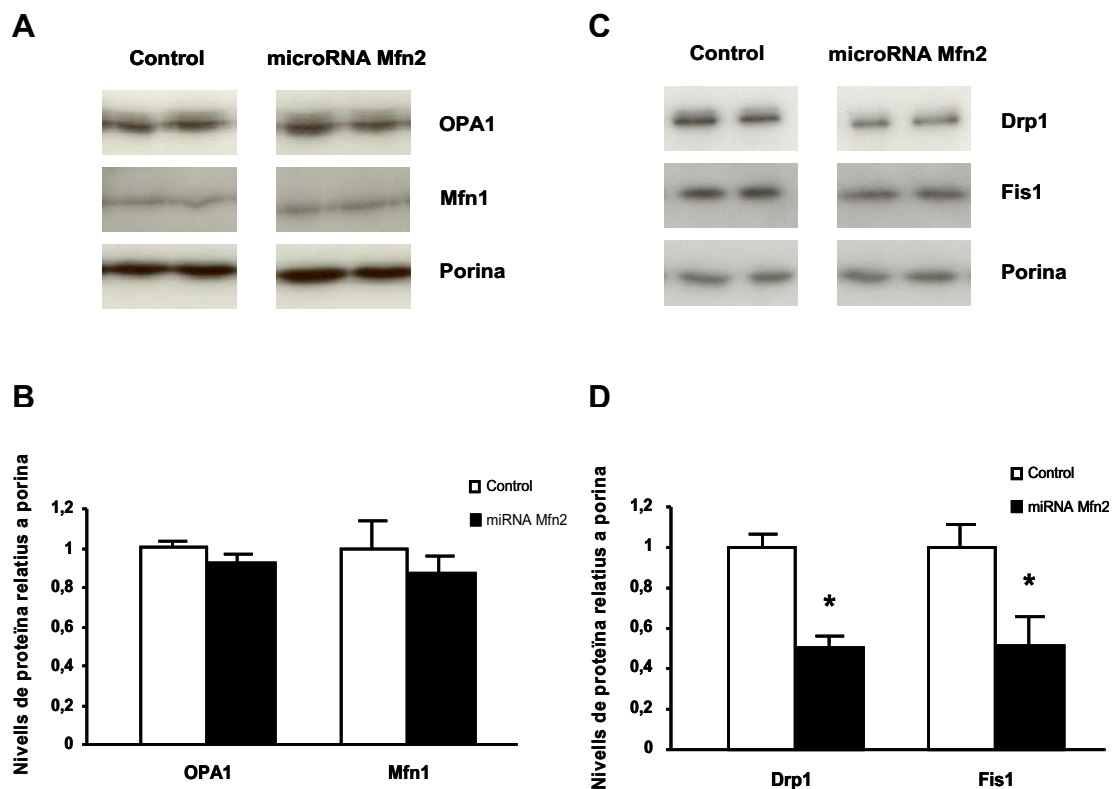


Figura 58. Efecte de la repressió de Mfn2 en l'expressió d'altres proteïnes implicades en dinàmica mitocondrial. Anàlisi per *Western blot* (A) i quantificació per densitometria (B) de les proteïnes de fusió mitocondrial OPA1 i Mfn1. Anàlisi per *Western blot* (C) i quantificació per densitometria (D) de les proteïnes de fissió mitocondrial Drp1 i Fis1. Aquests anàlisis s'han realitzat en homogenats totals de tibialis de ratolins electroporats amb el miRNA control i amb el miRNA contra Mfn2 (40µg de proteïna). Es mostra la mitja i el seu error estàndard dels nivells de cada proteïna relatius a l'expressió de la proteïna mitocondrial porina. N = 5 animals per grup. * indica diferències estadísticament significatives (p<0,05) d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

C.4.3) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'oxidació de glucosa

Una vegada demostrat que la repressió de Mfn2 en múscul esquelètic de ratolí no produïa cap canvi a nivell de quantitat i morfologia dels mitocondris, vam voler estudiar els seus possibles efectes metabòlics. Atès que la repressió de Mfn2 en cèl·lules L6E9 provoca una disminució en l'oxidació de glucosa (Bach *et al.*, 2003), el primer experiment que ens vam plantejar va ser la mesura de l'oxidació de glucosa en múscul.

Els experiments d'oxidació de glucosa es van realitzar en ratolins Mfn2 KO mascles de 20 setmanes d'edat. Els animals van ser sacrificats i els soleus ràpidament extrets i incubats en KRBH més 5 mM de glucosa no marcada. Es va addicionar D-[U]-¹⁴Cglucosa (1 µCi/ml) al medi d'incubació i es va mesurar el CO₂ marcat radioactivament capturat al paper de filtre (apartat E.3 de Materials i Mètodes). Els soleus dels ratolins control presentaren una taxa d'oxidació de glucosa de 1448,9 ± 73,3 nmol / h·g de teixit, mentre que en el cas del ratolí Mfn2 KO l'oxidació fou de 1183,3 ± 105,3 nmol / h·g de teixit (Figura 59). Aquestes diferències entre els dos grups foren estadísticament significatives, amb una $p < 0,05$. Així doncs, la repressió de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic provoca una disminució del 20% en l'oxidació de glucosa respecte els controls, resultats oposats als obtinguts en sobreexpressar la forma truncada hMfn2Δ614-757.

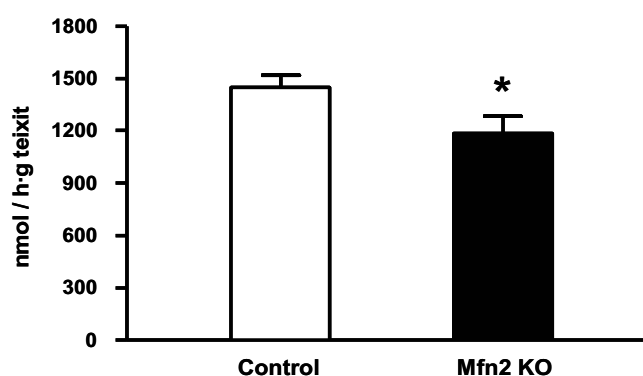


Figura 59. Efecte de la repressió de Mfn2 en l'oxidació de glucosa en múscul esquelètic. Es va determinar l'oxidació de glucosa en soleus de ratolins control i ratolins Mfn2 KO. Els resultats són mitges ± errors estàndard de n= 10-12 ratolins i s'expressen com a nmol de glucosa oxidats durant 1 h per g de teixit. * indica diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

En aquests mateixos soleus, també es mesurà la quantitat de glucosa que s'havia incorporat a glicogen durant l'hora d'incubació (apartat E.4 de Materials i Mètodes). En

aquest cas no s'observaren diferències significatives entre els ratolins control ($3,34 \pm 0,22$ nmol glucosa / h·g de teixit) i els ratolins Mfn2 KO ($3,05 \pm 0,27$ nmol glucosa / h·g de teixit) (Figura 60).

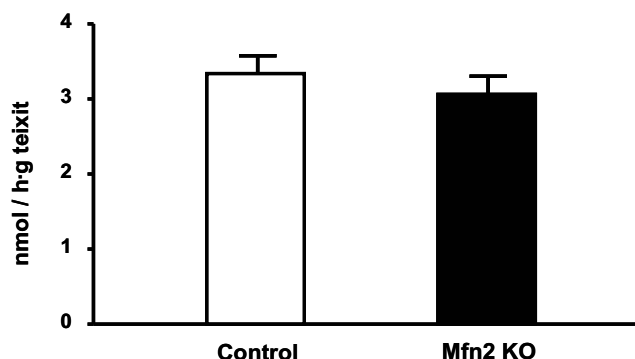


Figura 60. Efecte de la repressió de Mfn2 en la incorporació de glucosa a glicogen. Els soleus de ratolins control i ratolins Mfn2 KO s'incubaren en medi KRBH 5 mM glucosa i 1 μ Ci/ml de D-[U]- 14 Cglucosa i es mesurà el glicogen marcat radioactivament acumulat al teixit. Els resultats són mitges \pm errors estàndard de n= 10-12 ratolins i s'expressen com a nmol de glucosa incorporats a glicogen durant 1 h per g de teixit.

C.4.4) Efectes de la repressió de Mfn2 en la taxa de consum d'oxigen

La reducció en l'oxidació de glucosa observada en reprimir l'expressió de Mfn2 (apartat C.4.3) ens va fer pensar en la possibilitat que aquests músculs presentessin una menor activitat mitocondrial. Per altra banda, i tenint en compte els resultats de respirometria obtinguts en el model cel·lular C2C12 (apartat A.3.2), vàrem estudiar el funcionament global de la cadena respiratòria mitocondrial en el múscul esquelètic dels ratolins KO de Mfn2 mesurant la taxa de consum d'oxigen en fibres musculars permeabilitzades utilitzant l'*oxygraph-2k* (OROBOROS). Per realitzar aquest tipus d'experiments es van utilitzar 6 ratolins control i 6 ratolins Mfn2 KO de 20 setmanes d'edat. Es sacrificaren els ratolins, s'obtingueren els tibialis i es permeabilitzaren amb saponina 50 μ g/ml. Immediatament, es transferiren les fibres permeabilitzades (2-4 mg) a les cambres de l'*oxygraph-2k* i es mesurà el consum d'oxigen en diferents estats respiratoris, descrits detalladament a l'apartat E.2.2 de Materials i Mètodes. El protocol seguit és exactament el mateix que en el cas de l'expressió de la forma truncada de Mfn2 (apartat B.3.3) i es basa en l'addició successiva de diferents substrats i inhibidors a les cambres de l'*oxygraph-2k* (Figura 61).

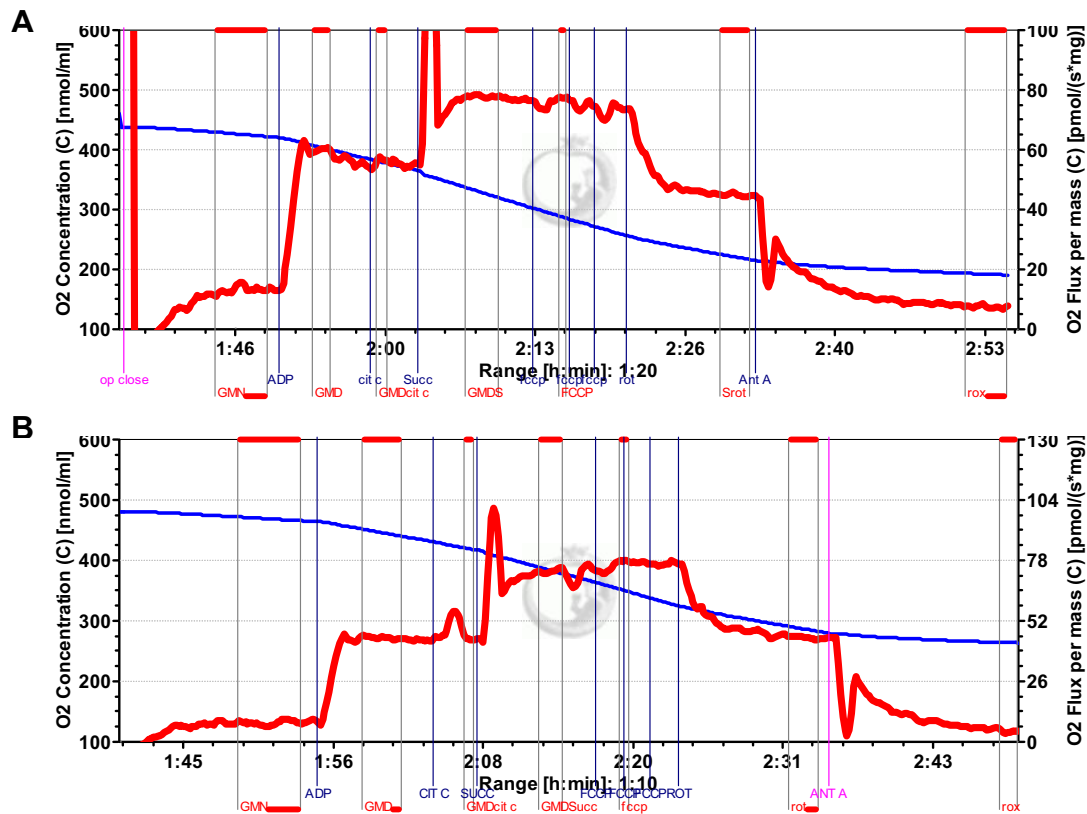


Figura 61. Mesura del consum d'oxigen en fibres musculars permeabilitzades del model Mfn2 KO. Resultats representatius de 6 experiments independents, amb 4 rèpliques per experiment. **(A)** Tibialis de ratolí control i **(B)** tibialis de ratolí KO de Mfn2. La línia blava és la concentració d'O₂ en nmol/ml i la línia vermella és el consum d'oxigen per mg de múscul, expressat en pmol/s·mg. Les marques verticals en color blau indiquen el moment en què s'ha afegit cada compost (en aquest ordre: ADP, citocrom c, succinat, FCCP, rotenona i antimicina A). Els intervals marcats en vermell indiquen el període estable en què s'ha mesurat el consum d'oxigen en cada un dels diferents estats respiratoris. GMN: glutamat + malat; GMD: glutamat + malat + ADP; GMDS: glutamat + malat + ADP + succinat; Srot: succinat + rotenona; rox: consum d'oxigen no mitocondrial. L'eix de les x representa el temps que dura l'experiment.

La respiració mitocondrial basal mesurada en presència de glutamat i malat (substrats pel complex I) fou de $5,28 \pm 0,62$ pmol O₂ / s·mg en les fibres dels músculs dels ratolins control i de $5,91 \pm 0,43$ pmol O₂ / s·mg en les fibres dels músculs dels ratolins KO de Mfn2. L'addició d'ADP estimulà el consum d'oxigen fins a $43,5 \pm 4,6$ pmol O₂ / s·mg en els controls i fins a $37,8 \pm 4,4$ pmol O₂ / s·mg en el cas dels ratolins KO. En cap dels dos casos el citocrom c no incrementà significativament la respiració, indicant que la membrana mitocondrial externa es trobava intacta i per tant, que el procés de permeabilització de les fibres no havia danyat els mitocondris. L'addició del succinat (substrat pel complex II) estimulà la respiració fins a $58,8 \pm 5,9$ pmol O₂ / s·mg i $54,7 \pm 5,9$ pmol O₂ / s·mg en controls i KO de Mfn2, respectivament. En desacoblar la cadena de transport electrònic de la síntesi d'ATP amb FCCP, no s'observà cap augment en el consum d'oxigen en cap dels dos grups. En inhibir el complex I amb rotenona, el

consum d'oxigen disminuï a $29,6 \pm 3,5$ pmol O_2 / s·mg en les fibres dels músculs control i a $28,7 \pm 2,8$ pmol O_2 / s·mg en les fibres dels músculs KO (Figura 62). Cal remarcar que la capacitat respiratòria màxima (mesurada en presència de glutamat, malat, ADP, succinat i FCCP) no s'alterà en les fibres musculars permeabilitzades dels ratolins KO de Mfn2 respecte els ratolins control.

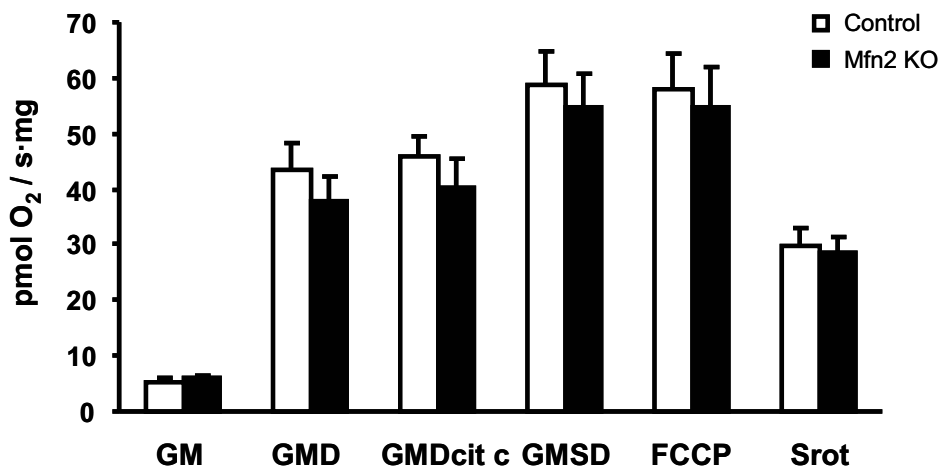


Figura 62. Efecte de la repressió de Mfn2 sobre el consum d'oxigen mitocondrial en fibres musculars permeabilitzades. Mesura de la taxa de consum d'oxigen en fibres permeabilitzades en diferents estats respiratoris. El gràfic mostra la respiració mitocondrial, una vegada sostret el valor de consum d'oxigen obtingut en inhibir el complex III amb antimicina A. Els resultats són mitges \pm errors estàndard de n=6 animals control i 6 KO de Mfn2 i s'expressen com a pmol d'oxigen consumit per segon i per mg de teixit. GM: glutamat + malat; GMD: glutamat + malat + ADP; cit c: citocrom c; GMSD: glutamat + malat + ADP + succinat; Srot: succinat + rotenona.

Tot i que les diferències en el consum d'oxigen mitocondrial no foren estadísticament significatives, sí que s'observà una clara tendència a una menor respiració, amb substrats del complex I (GMD), en els ratolins Mfn2 KO respecte els controls. A partir dels valors absoluts de consum d'oxigen es va calcular la *Respiratory Control Ratio* (RCR) (apartat E.2.2 de Materials i Mètodes), que ens dóna informació sobre el grau d'acoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. La RCR és el quocient entre la respiració activada per ADP (estat 3 o GMD) i la respiració basal (estat 4 o GM). Utilitzant glutamat i malat com a substrats, s'obtingué una RCR de $8,74 \pm 0,56$ en les fibres dels músculs control i de $7,07 \pm 0,26$ en les fibres dels músculs dels ratolins KO. Aquestes diferències foren estadísticament significatives amb una $p=0,02$ (Figura 63).

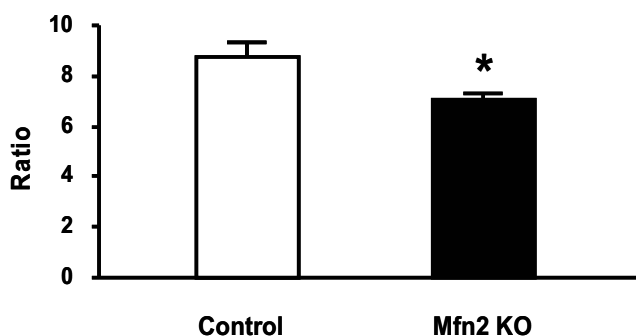


Figura 63. Respiratory Control Ratio (RCR) del model Mfn2 KO. La RCR amb substrats pel complex I (glutamat i malat) es calculà com el quocient entre el consum d'oxigen amb i sense ADP. Els resultats són mitges \pm errors estàndard de n=6 tibialis per grup. * indica diferències estadísticament significatives amb $p = 0,02$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

També es calculà la *Succinate Control Ratio* (SCR), que és el quocient entre la respiració obtinguda amb substrats pels complexos I + II i el consum d'oxigen amb substrats pel complex I. La SCR obtinguda fou de $1,35 \pm 0,01$ en els tibialis dels ratolins control i de $1,44 \pm 0,04$ en els tibialis dels ratolins Mfn2 KO (Figura 64). Això ens indica que l'estimulació de la respiració observada en addicionar succinat fou lleugerament superior en els KO que en els control, tot i no resultar estadísticament significativa ($p = 0,06$).

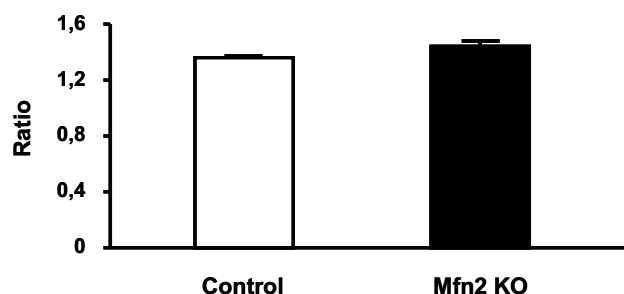


Figura 64. Succinate Control Ratio (SCR) del model Mfn2 KO. La SCR es calculà com el quocient entre el consum d'oxigen amb substrats pels complexos I+II i el consum d'oxigen amb substrats pel complex I. Els resultats són mitges \pm errors estàndard de n=6 tibialis per grup. Es realitzà una prova t Student amb dues cues de distribució i s'obtingué una $p = 0,06$.

C.4.5) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria

Per comprovar si els efectes generats per la repressió de Mfn2 sobre el metabolisme mitocondrial en múscul esquelètic (menor oxidació de glucosa, menor RCR) eren deguts a alteracions en la funcionalitat dels complexos de la cadena respiratòria, es mesurà l'activitat enzimàtica de cadascun dels complexos. Les activitats es van

determinar espectrofotomètricament (apartat E.1 de Materials i Mètodes) en homogenats de tibialis anterior del model de repressió transitòria de Mfn2.

En primer lloc es va determinar l'activitat enzimàtica de la citrat sintasa (CS), enzim de la matriu mitocondrial utilitzat com a marcador de la quantitat de mitocondris funcionals de la mostra. L'activitat CS fou de $560,4 \pm 21,9$ nmol/min·mg de proteïna en els músculs control i de $575,6 \pm 31,1$ nmol/min·mg en els músculs amb l'expressió de Mfn2 reprimida (Figura 65), no observant-se diferències significatives. Aquest resultat reforça el fet que la repressió de l'expressió de Mfn2 no altera el número de mitocondris respecte els músculs control, com ja havíem comprovat en determinar l'expressió de la proteïna mitocondrial porina o el número de còpies d'ADN mitocondrial (apartats C.1 i C.4.1 de Resultats).

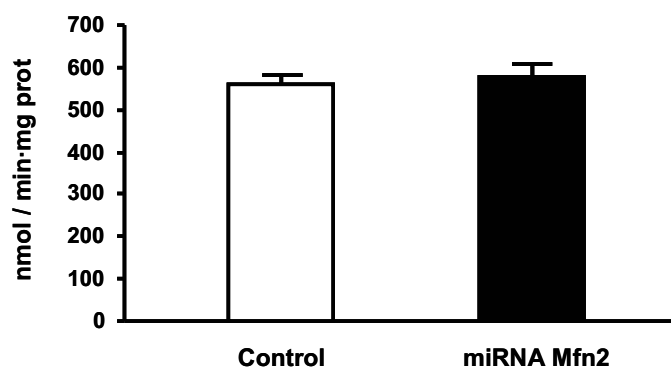


Figura 65. Activitat enzimàtica de la citrat sintasa en el model de repressió transitòria de Mfn2. Es va determinar l'activitat citrat sintasa en homogenats del múscul tibialis de ratolins control i ratolins electroporats amb el miRNA contra Mfn2 15 dies després de l'electrotransferència d'ADN. Els resultats són mitges \pm errors estàndard de n=12 tibialis per grup i s'expressen com a nmol / minut·mg de proteïna.

Posteriorment es determinaren les activitats de cadascun dels complexos de la cadena respiratòria per separat, així com també les activitats del complexos I + III i dels complexos II + III (apartat E.1 de Materials i Mètodes) (Figura 66).

La repressió de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic provocà una disminució significativa de l'activitat del complex IV d'aproximadament un 20% respecte els controls amb una $p < 0,05$. L'activitat dels complexos II + III es veié incrementada de manera significativa en un 15% ($p < 0,05$). En els músculs electroporats amb els miRNA contra Mfn2 també s'observà una tendència a l'augment en les activitats dels complexos II i V, si bé aquestes diferències no foren estadísticament significatives. La repressió de Mfn2 no alterà les activitats de la resta de complexos analitzats (CI, CI+III, i CIII).

A

Complexes	Control	miRNA Mfn2
CI	0,146 ± 0,013	0,156 ± 0,018
CII	0,077 ± 0,005	0,086 ± 0,007
CI+III	0,103 ± 0,004	0,106 ± 0,006
CII+III	0,016 ± 0,001	0,019 ± 0,001 *
CIII	0,206 ± 0,012	0,214 ± 0,019
CIV	2,200 ± 0,100	1,730 ± 0,160 *
CV	0,752 ± 0,037	0,931 ± 0,081

B

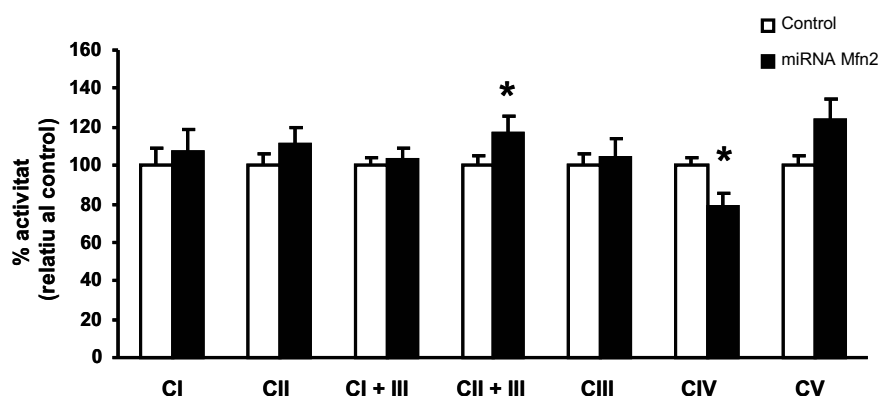


Figura 66. Efecte de la repressió de Mfn2 sobre les activitats enzimàtiques dels complexos de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. Les activitats enzimàtiques dels diferents complexos es van determinar en homogenats del múscul tibialis anterior de ratolins electroporats amb el vector control o amb el vector que codifica els 5 miRNA contra Mfn2 15 dies després de l'electrotransferència d'ADN. **(A)** A la taula es mostra l'activitat específica de cada complex, mesurada en nmol/min-mg proteïna, i relativitzada a l'activitat específica de la citrat sintasa. Les dades són les mitges ± error estàndard de n = 7-12 músculs per grup. **(B)** El gràfic mostra els mateixos resultats representats en el panell A però expressats com a percentatge d'activitat relativa al grup control. * indica diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

C.4.6) Efectes de la repressió de Mfn2 en l'expressió de subunitats dels complexos de la cadena respiratòria

Per comprovar si les diferències observades en les activitats dels complexos correlacionaven amb una menor expressió d'aquests, es va decidir analitzar, mitjançant *Western Blot* i *real-time PCR*, els nivells d'algunes de les subunitats dels complexos de la cadena de transport electrònic (Figures 67 i 68, respectivament). Pel que fa als nivells de proteïna, no s'observaren diferències en l'expressió de les subunitats Ndufa9, Uqcrc2 ni Atp5a1 (subunitats dels complexos I, III i V, respectivament). En canvi, es detectà una caiguda notable (del 75%) en l'expressió de la subunitat CoxIV (complex IV) i també una disminució en l'expressió de la subunitat SdhA (complex II) en els tibialis electroporats amb els miRNA contra la seqüència de Mfn2.

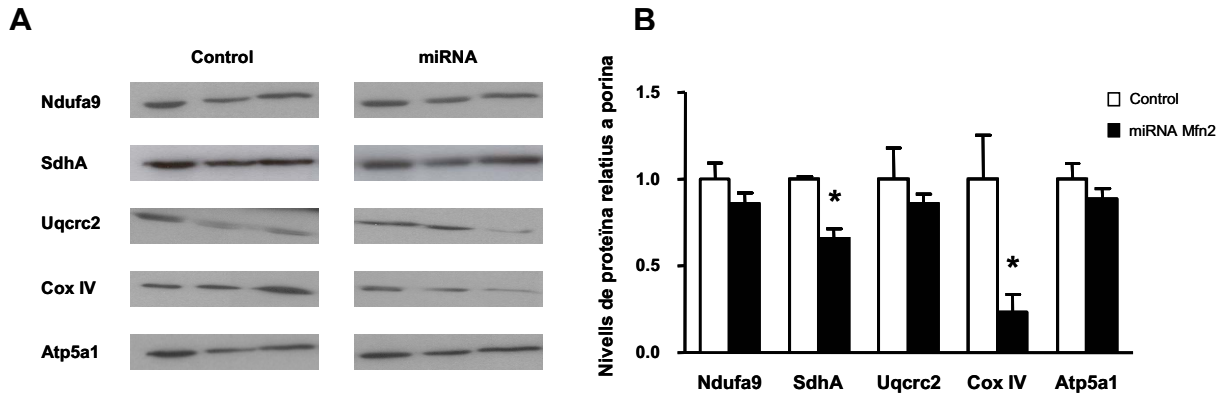


Figura 67. Efecte de la repressió de Mfn2 sobre els nivells de proteïna dels complexos de la cadena respiratòria. (A) Anàlisi per *Western blot* de les subunitats Ndufa9 (complex I), SdhA (complex II), Uqcrc2 (complex III), CoxIV (complex IV) i Atp5a1 (complex V) en homogenats totals de tibialis anterior de ratolins electroporats amb el vector control i amb el vector que codifica els miRNAs contra Mfn2 (40µg de proteïna). (B) Quantificació per densitometria de l'expressió de les subunitats dels complexos. Es mostra la mitja i el seu error estàndard dels nivells de cada proteïna relatius a l'expressió de la proteïna mitocondrial porina. N=6 animals per grup. * indica diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

Respecte a la quantificació dels nivells d'ARN missatger d'aquestes mateixes subunitats per *real-time PCR*, no es detectaren diferències significatives en cap d'elles entre els dos grups.

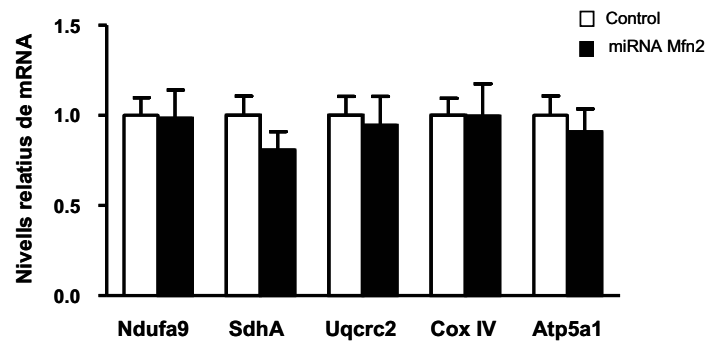


Figura 68. Efecte de la repressió de Mfn2 sobre els nivells d'ARN missatger dels complexos de la cadena respiratòria. *Real-time PCR* de les subunitats Ndufa9 (complex I), SdhA (complex II), Uqcrc2 (complex III), CoxIV (complex IV) i Atp5a1 (complex V). Les barres mostren la mitja, i el seu error estàndard, dels nivells de cada gen relatius als de β -actina, gen utilitzat com a *housekeeping*. N = 6 animals per grup. Es realitzà una prova t Student amb dues cues de distribució però no s'observaren diferències estadísticament significatives.

C.4.7) Efectes de la repressió de Mfn2 en la formació i estabilitat dels complexos i supercomplexos de la cadena respiratòria

Ja que els efectes de la repressió de Mfn2 sobre l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria no s'expliquen només per mecanismes transcripcionals, vam voler analitzar l'estabilitat d'aquests complexos i la formació dels supercomplexos. Per fer-ho,

vam realitzar assajos d'electroforesi en condicions natives (*Blue Native*) de fraccions mitocondrials de gastrocnemi de ratolins control ($mef2C-Cre^{-/-}$ $Mfn2^{loxP/loxP}$) i de ratolins $Mfn2$ KO ($mef2C-Cre^{+/-}$ $Mfn2^{loxP/loxP}$). La BN-PAGE es realitzà de la mateixa manera que en el cas de l'expressió de la forma truncada de $Mfn2$ (apartat 2.3.6 de Resultats), solubilitzant els mitocondris amb dos detergents diferents: digitonina i DDM. Seguidament es van dur a terme anàlisis *Western Blot* amb anticossos específics contra diferents subunitats dels complexos.

En el cas de la solubilització amb digitonina, en els ratolins $Mfn2$ KO s'observà un lleuger increment de les formes monomèriques dels complexos II, IV i V, mentre que el complex I monòmer no varià i el III presentà una tendència a disminuir (Figura 69).

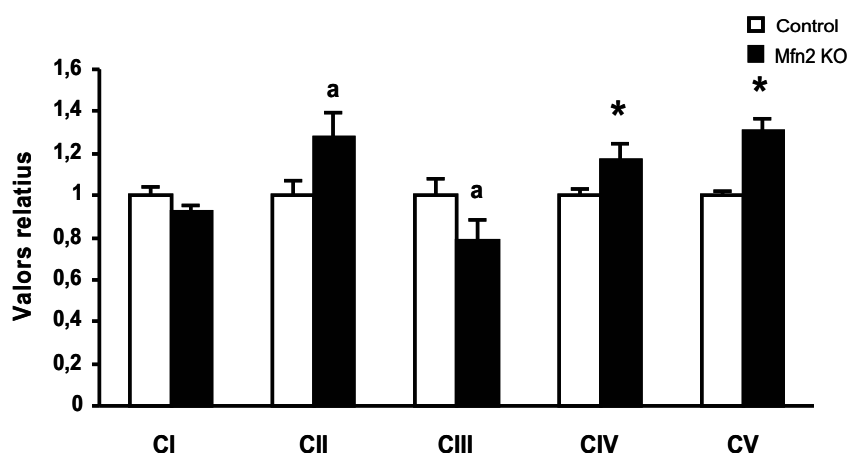


Figura 69. Quantificació dels complexos de la cadena respiratòria solubilitzats amb digitonina del model $Mfn2$ KO. Es mostra la mitja i el seu error estàndard dels nivells de cada complex. $N = 6$ animals per grup. * indica diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució. ^a indica diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) d'una prova t Student realitzada amb una cua de distribució.

En els ratolins $Mfn2$ KO es veié un increment en les 2 bandes d'alt pes molecular corresponents als supercomplexes I+III i I+III+IV respecte els ratolins control. Aquest increment només fou estadísticament significatiu en el cas del supercomplex I+III+IV (Figura 70A). També vam calcular la relació quantitativa entre els supercomplexes i les formes monomèriques dels complexos que els formen. Els gastrocnemis dels ratolins $Mfn2$ KO presentaren una major proporció dels supercomplexes I+III i I+III+IV en relació al monòmer del complex I (Figura 70C). En ambdós casos aquestes diferències foren estadísticament significatives ($p < 0,05$).

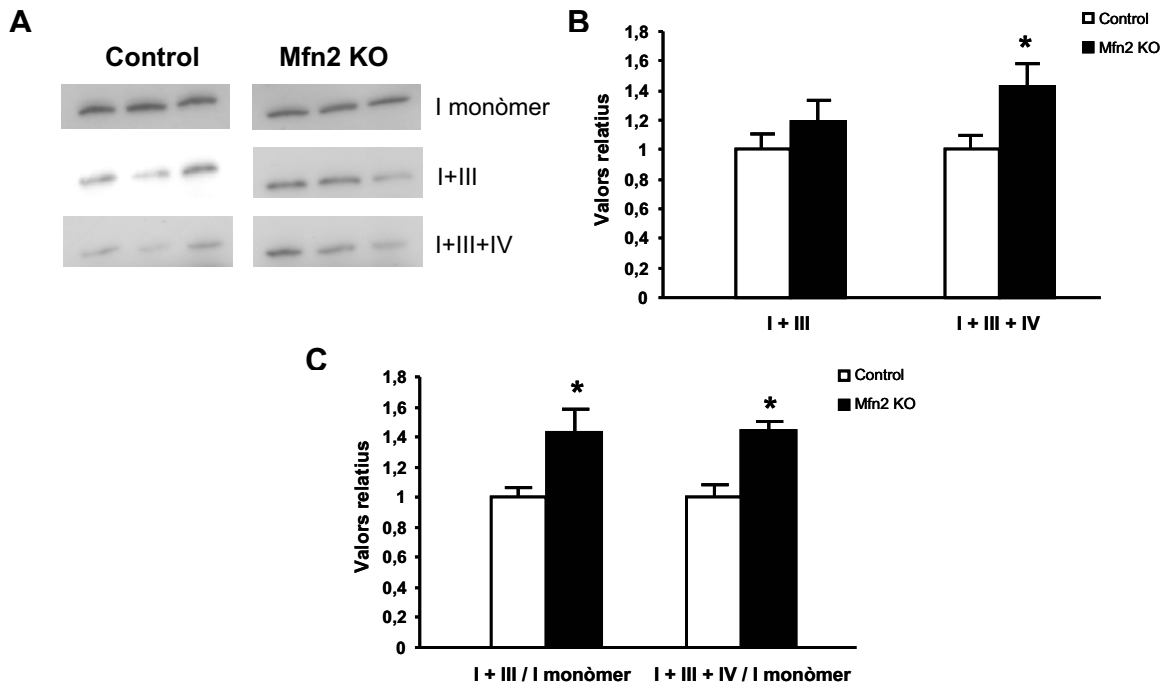


Figura 70. Detecció dels supercomplexes en assajos de BN-PAGE de fraccions mitocondrials de gastrocnemis solubilitzades amb digitonina. (A) *Western blot* amb l'anticòs contra la subunitat Ndufa9 (complex I). Es detecta el monòmer del complex I i els supercomplexes I+III i I+III+IV. **(B)** Quantificació per densitometria dels supercomplexes I+III i I+III+IV. **(C)** Relació entre els supercomplexes I+III i I+III+IV i la forma monomèrica del complex I. Es mostra la mitja i el seu error estàndard dels nivells de cada complex referit al control. N = 6 animals per grup. * indica diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) d'una prova t Student realitzada amb dues cues de distribució.

Quan es solubilitzaren els mitocondris amb DDM s'observà que la quantitat total dels complexos I, IV i V no varià en els ratolins Mfn2 KO. En canvi, la quantitat total de complex III sí que augmentà en els ratolins KO respecte els control (Figura 71). També s'observà un increment en la quantitat total del complex II en els ratolins Mfn2 KO, tot i que no fou estadísticament significatiu.

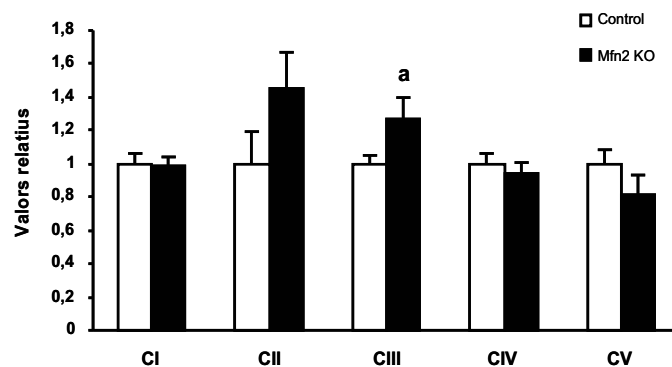


Figura 71. Quantificació dels complexos de la cadena respiratòria solubilitzats amb DDM del model Mfn2 KO. Es mostra la mitja i el seu error estàndard dels nivells de cada complex. N = 6 animals per grup. ^a indica diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) d'una prova t Student realitzada amb una cua de distribució.

DISCUSSIÓ

Resultats previs obtinguts en el nostre laboratori en diferents línies cel·lulars indiquen que Mfn2 participa en el control del metabolisme mitocondrial, regulant el potencial de membrana, l'oxidació de substrats i el sistema OXPHOS (Bach *et al.*, 2003; Pich *et al.*, 2005). Aquests precedents, juntament amb el fet que l'expressió de Mfn2 es troba disminuïda en múscul esquelètic d'individus obesos i diabètics (Bach *et al.*, 2003 i 2005), converteixen aquesta proteïna en un candidat molt interessant com a modulador del metabolisme mitocondrial en aquest teixit. En la present tesi doctoral hem estudiat els efectes de la modulació de l'expressió de Mfn2 sobre el metabolisme mitocondrial en múscul esquelètic. Amb aquest objectiu, hem sobreexpressat i reprimint aquesta proteïna en el model cel·lular C2C12 així com en múscul esquelètic de ratolí. Per abordar aquesta segona aproximació s'han generat diferents models murins: el model d'expressió transitòria de la forma truncada de Mfn2 (hMfn2 Δ 614-757), el model de repressió transitòria de Mfn2 i el model de repressió permanent de Mfn2 en múscul esquelètic (Mfn2 KO).

A) EXPRESSIÓ DE LA FORMA hMfn2 Δ 614-757

La sobreexpressió de Mfn2 humana en cèl·lules HeLa provoca un important increment en el potencial de membrana mitocondrial, així com un notable augment en la taxa d'oxidació de glucosa d'aquestes cèl·lules. Aquestes alteracions metabòliques però, van associades a una agregació perinuclear dels mitocondris (Pich *et al.*, 2005). Per intentar veure si els efectes metabòlics observats es devien únicament a l'agregació mitocondrial, en el nostre laboratori es va generar la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 (Pich, 2004). La sobreexpressió d'aquesta forma en cèl·lules HeLa també produeix un augment del metabolisme mitocondrial, però aquest efecte té lloc en absència d'alteracions en la xarxa mitocondrial (Pich *et al.*, 2005). Per aquest motiu, durant la realització d'aquesta tesi es va decidir sobreexpressar la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 i no la salvatge en els diferents models utilitzats.

A.1) EFECTES SOBRE EL METABOLISME MITOCONDRIAL EN CÈL·LULES C2C12

Mitjançant la transducció de miotubs C2C12 amb adenovirus recombinants s'aconseguien bons nivells d'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757, entre 20 i 30

vegades superior a l'expressió de Mfn2 endògena. No s'observaren canvis en l'expressió de Mfn2 endògena ni de la proteïna mitocondrial porina, suggerint que la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 no altera la massa mitocondrial en aquesta línia cel·lular.

Atès que resultats precedents obtinguts en sobreexpressar la forma hMfn2 Δ 614-757 en cèl·lules HeLa indicaven un augment en el metabolisme cel·lular, vam estudiar, utilitzant un model cel·lular de múscul, si aquest fet es traduïa en un increment en el consum d'oxigen mitocondrial. Per fer-ho, es van realitzar experiments de respirometria en cèl·lules C2C12 diferenciades. Els miotubs que sobreexpressen la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 presentaren un increment del 25% en el consum d'oxigen mitocondrial tant en rutina com en desacoblar la cadena respiratòria de la síntesi d'ATP. En canvi, quan s'inhibí l'ATP sintasa, estat L, no s'alterà el consum d'oxigen no lligat a la fosforilació oxidativa, i que és degut majoritàriament al *proton leak* (apartat A.1 de la Introducció). Aquest fet suggereix que el major consum d'oxigen observat en estat de rutina no es deu a una disminució de l'eficiència energètica dels mitocondris provocada per un augment del *proton leak*, sinó que es troba totalment acoblat a la síntesi d'ATP.

La respiració en la situació de rutina depèn dels substrats presents al medi de cultiu (DMEM 5,5 mM de glucosa en aquest cas) i dels requeriments energètics cel·lulars (Gnaiger, 2007). Així doncs, l'augment del consum d'oxigen en estat de rutina observat en els miotubs que expressen la forma truncada de Mfn2 es podria explicar per una major demanda d'ATP en aquestes cèl·lules. Des d'aquest punt de vista, tot i que no ho hem fet, seria interessant mesurar la producció d'ATP en aquestes condicions, ja que si l'increment de la respiració està acoblat a la síntesi d'ATP, esperaríem detectar-ne una major quantitat en els miotubs que expressen la forma hMfn2 Δ 614-757. No obstant, el fet de tenir incrementada també la respiració quan afegim FCCP, estat E, on l'ATP sintasa també roman inhibida, suggereix que la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 en miotubs C2C12 el que produeix és un augment de la capacitat del sistema de transport electrònic en aquest model cel·lular. És important remarcar que els miotubs C2C12 presenten una elevada capacitat respiratòria de reserva respecte el que consumeixen en condicions fisiològiques, lleugerament superior a la descrita per altres models cel·lulars (cèl·lules endotelials i fibroblasts; Stadlmann *et al.*, 2002; Renner *et al.*, 2003; Hutter *et al.*, 2004). Aquest fet queda palès en calcular la *Routine Flux Control Ratio* (R/E), que ens diu que tant els miotubs C2C12 control com els que

sobreexpressen la forma truncada de Mfn2 només utilitzen un 23-24% de la seva capacitat del sistema de transport electrònic en la respiració de rutina.

Per altra banda, la *Phosphorylation Respiratory Control Ratio* ((R-L)/E) i la *Leak Flux Control Ratio* (L/E) indiquen un fort grau d'acoblament del sistema OXPHOS en miotubs C2C12 independentment de la sobreexpressió de la forma truncada de Mfn2. Aproximadament un 21% de la capacitat respiratòria màxima s'utilitza per a la producció d'ATP, mentre que la respiració no acoblada a la síntesi d'ATP (*proton leak*) representa menys del 3% del total. Amb tot, aquestes dades indiquen que els miotubs C2C12 que sobreexpressen hMfn2 Δ 614-757 tenen una capacitat respiratòria més elevada que els miotubs control, i que aquest augment és independent de canvis en el grau d'acoblament entre la cadena de transport electrònic i la síntesi d'ATP.

Per veure si la major capacitat respiratòria observada en els miotubs C2C12 que sobreexpressen hMfn2 Δ 614-757 estava associada a diferències en l'expressió dels components del sistema OXPHOS, es va analitzar l'expressió de diferents subunitats dels complexos del sistema de transport electrònic. No es detectaren diferències ni a nivell proteic ni a nivell d'ARN missatger entre miotubs control i miotubs que expressen la forma hMfn2 Δ 614-757. En aquestes condicions doncs, el major consum d'oxigen observat en miotubs C2C12 que sobreexpressen hMfn2 Δ 614-757 no sembla estar relacionat amb els nivells d'expressió dels complexos de la cadena respiratòria. Sí que podria ser degut però, a una major activitat enzimàtica d'algun dels complexos, malgrat que aquesta possibilitat no ha estat estudiada en miotubs C2C12.

Considerant que la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 no té activitat de fusió, no sembla que els efectes de la seva expressió sobre el consum d'oxigen puguin ser deguts a modificacions de la xarxa mitocondrial. Així doncs, podríem hipotetitzar que aquests efectes els exerceix mitjançant la interacció amb altres proteïnes a través del domini CC1 i el domini ric en prolines. A més, no sabem si els efectes sobre el metabolisme són dependents de l'activitat GTPasa de Mfn2, com sí que succeeix en el cas de la fusió. En aquest sentit seria interessant veure si mutacions en el domini GTPasa revertirien els efectes metabòlics observats.

A.2) EFECTES SOBRE EL METABOLISME MITOCONDRIAL EN MÚSCUL ESQUELÈTIC

Per estudiar els efectes de l'expressió de la forma truncada de Mfn2 en múscul esquelètic de ratolí, es va generar un model d'expressió transitòria d'aquesta proteïna mitjançant l'electrotransferència d'ADN. Amb aquesta metodologia s'obtingué una bona expressió de hMfn2 Δ 614-757, especialment en el tibialis anterior i en menor grau en el gastrocnemi i el quàdriceps. Tot i així, cal destacar que els nivells d'expressió d'aquesta forma truncada en múscul esquelètic, de 2 a 4 cops més gran que l'expressió de Mfn2 endògena, són més baixos que els obtinguts en models cel·lulars. En aquest model tampoc s'observaren canvis en l'expressió de Mfn2 endògena, ni en la quantitat de la proteïna mitocondrial porina, emprada com a marcador de la quantitat de mitocondris d'una mostra.

Inicialment vam fer una fenotipació global d'aquest model, malgrat que el fet que la forma truncada de Mfn2 s'expressi només en els músculs electroporats dificultava l'observació d'un fenotip general. Els ratolins que expressen la forma hMfn2 Δ 614-757 no mostraren diferències estadísticament significatives respecte els ratolins control en cap dels paràmetres analitzats, ni en el test de tolerància a la glucosa ni en la glucèmia o la insulinèmia en condicions de dejuni o en alimentació. El que sí que s'observà, tot i no resultar estadísticament significatiu, fou que aquests ratolins havien guanyat menys pes que els controls 15 dies després de l'electroporació. Aquest resultat podria suggerir que els músculs que sobreexpressen la forma hMfn2 Δ 614-757 presenten una despesa energètica més elevada que els controls.

Per estudiar els efectes de la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 directament sobre el metabolisme mitocondrial de múscul esquelètic, es van realitzar diferents experiments *ex vivo* en aquest teixit. Es va mesurar l'oxidació de glucosa, observant-se que l'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en múscul esquelètic estimula l'oxidació de glucosa basal en un 50% respecte els músculs control. Aquest resultat demostra per primera vegada en un model animal que la sobreexpressió de la forma truncada de Mfn2 estimula el metabolisme mitocondrial, i confirma els resultats obtinguts prèviament en models cel·lulars (Pich *et al.*, 2005). A més, reforça els resultats de respirometria observats en els miotubs C2C12 que sobreexpressen hMfn2 Δ 614-757, que presenten un major consum d'O₂ utilitzant glucosa com a

substrat. Aquest increment en l'oxidació de glucosa correlaciona també amb resultats previs obtinguts pel Dr. Francesc Xavier Soriano, en què es demostrà que l'expressió de Mfn2 és major en músculs oxidatius com el soleus que en músculs glicolítics com l'EDL (Soriano, 2004).

Degut als resultats obtinguts en l'oxidació de glucosa en el model animal, així com també als resultats en el consum d'oxigen en miotubs C2C12, vàrem analitzar per respirometria el comportament dels músculs que sobreexpressen hMfn2 Δ 614-757 respecte els controls. Es mesurà la taxa de consum d'oxigen en fibres musculars permeabilitzades utilitzant diferents substrats. És important remarcar que en totes les mesures realitzades la membrana mitocondrial externa es trobava intacta, i que per tant, els mitocondris no havien estat danyats durant el procés de permeabilització de les fibres. Aquest fet es demostra en no observar-se una estimulació de la respiració després de l'addició de citocrom c (GMD cit c). Inicialment es mesurà la respiració basal només en presència de glutamat i malat (Estat 4), posteriorment s'afegí ADP a una concentració saturant (Estat 3) i després s'addicionà succinat per estimar la capacitat de la fosforilació oxidativa en presència de substrats dels complexos I + II (GMDS). Seguidament s'afegí el desacoblant FCCP, que no provocà cap augment en el consum d'oxigen de les fibres permeabilitzades en cap dels dos grups, indicant que la capacitat respiratòria màxima d'aquestes s'obté amb els substrats glutamat, malat i succinat (GMDS). S'ha descrit que l'addició de FCCP estimula la respiració en múscul esquelètic humà (Boushel *et al.*, 2007; Gnaiger, 2009), en canvi, això no succeeix en múscul esquelètic de ratolí (Aragonés *et al.*, 2008), fet confirmat pels nostres resultats.

La gran variabilitat experimental (nivell de sobreexpressió de la proteïna, diferent grau de permeabilització de les fibres, la pròpia variabilitat entre animals,...) no ens permeté detectar diferències significatives en els valors absoluts de consum d'oxigen entre músculs control i els que sobreexpressen la forma truncada. En canvi, el càlcul de les *ratios*, on els valors de consum d'oxigen es relativitzen, sí que ens possibilita veure diferències estadísticament significatives. Així, les fibres dels músculs que expressen la forma hMfn2 Δ 614-757 presentaren un increment significatiu de la *Respiratory Control Ratio* (RCR) respecte els músculs control. La RCR s'ha calculat com el quocient entre la respiració activada per ADP (Estat 3) i la respiració basal (Estat 4), utilitzant glutamat i malat com a substrats. Així doncs, l'augment observat en la RCR ens indica que la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 en múscul esquelètic provoca un increment en la respiració estimulada per ADP respecte els controls, suggerint que aquests músculs són

metabòlicament més actius. Aquests resultats, tot i les diferències metodològiques, van en el mateix sentit que els obtinguts en els experiments de respirometria realitzats en el model cel·lular C2C12. La capacitat respiratòria màxima de les fibres musculars que sobreexpressen hMfn2 Δ 614-757 no es troba alterada, a diferència del que succeeix en el model cel·lular. S'ha de tenir en compte, però, que en el cas de les fibres permeabilitzades, els substrats i l'ADP es troben a una concentració saturant, mentre que els experiments en miotubs C2C12 es realitzen en unes condicions més properes a les fisiològiques.

El major consum d'oxigen acoblat a la síntesi d'ATP observat en cèl·lules C2C12 que sobreexpressen la forma hMfn2 Δ 614-757, així com els increments en la respiració activada per ADP i en la taxa d'oxidació de glucosa detectats en músculs que expressen la forma truncada, confirmen la implicació de Mfn2 en el metabolisme mitocondrial. A més, els resultats obtinguts van en consonància amb el fet que l'expressió de Mfn2 s'indueix en situacions en què es requereix una elevada despesa energètica, com l'exercici, l'exposició al fred o l'administració d'agonistes β -adrenèrgics (Cartoni *et al.*, 2005; Soriano *et al.*, 2006).

L'exercici millora la capacitat oxidativa muscular induint biogènesi mitocondrial a través de l'activació de PGC-1 α (Holloszy *et al.*, 1976; Hood, 2001; Ljubicic *et al.*, 2010). En un primer moment, vam pensar que aquest podria ser un dels mecanismes que expliqués l'increment en l'oxidació de glucosa i en el consum d'oxigen observats en expressar la forma truncada de Mfn2. En aquest sentit, però, hem demostrat de diferents maneres que l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 no altera la quantitat de mitocondris en múscul esquelètic. Així, no es detectaren canvis en el número de còpies d'ADN mitocondrial ni en l'expressió de la proteïna mitocondrial porina. Mitjançant l'anàlisi del múscul tibialis anterior de ratolins control i de ratolins que expressen la forma truncada de Mfn2 per microscopia electrònica de transmissió, tampoc es veieren diferències en la quantitat ni en la morfologia dels mitocondris. Per últim, no s'observaren diferències en l'activitat enzimàtica de la citrat sintasa, enzim del cicle de Krebs utilitzat habitualment com a marcador de la quantitat de mitocondris funcionals d'una mostra (Holloszy *et al.*, 1970; Hood *et al.*, 1989). Aquestes observacions indiquen que els efectes de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757 sobre l'oxidació de glucosa i el consum d'oxigen no es deuen a canvis en la massa mitocondrial.

Per intentar esbrinar els mecanismes de l'estimulació del metabolisme causada per l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757, vam analitzar l'activitat enzimàtica dels complexos de la cadena respiratòria mitocondrial. Els músculs que expressen la forma truncada de Mfn2 mostraren un increment en les activitats dels complexos I + III i III, així com una tendència a l'augment de l'activitat del complex I. Aquests resultats correlacionen amb els obtinguts per BN-PAGE, on vam observar un increment en la proporció dels supercomplexos I+III₂ i I+III₂+IV respecte a la forma monomèrica del complex I en músculs que sobreexpressen hMfn2 Δ 614-757. Es postula que la presència d'aquests supercomplexos incrementa l'eficiència de la cadena de transport electrònic (Lenaz i Genova, 2010). Així doncs, aquests resultats suggereixen que l'expressió de la forma truncada de Mfn2 en múscul esquelètic podria incrementar l'eficiència de la cadena respiratòria mitocondrial.

L'augment de l'activitat d'aquests complexos podria explicar l'increment del consum d'oxigen estimulat per ADP, en presència de substrats del complex I, observat per respirometria. Per comprovar si l'augment en les activitats enzimàtiques mencionades correlacionava amb una major expressió dels complexos de la cadena de transport electrònic, s'analitzaren per *Western Blot* els nivells d'algunes de les seves subunitats. No s'observaren diferències en l'expressió de les subunitats Ndufa9 del complex I ni Uqcrc2 del complex III; en canvi, es detectà un increment en l'expressió proteica de les subunitats CoxIV i Atp5a1 (complexos IV i V, respectivament) en els ratolins que expressen la forma truncada hMfn2 Δ 614-757. No s'observaren però, diferències en els nivells d'ARN missatger de cap de les subunitats analitzades. Aquest fet suggereix que la sobreexpressió de la forma truncada de Mfn2 no altera la transcripció dels gens que codifiquen aquestes subunitats. Tanmateix, aquesta opció no es pot descartar completament ja que la regulació transcripcional podria haver tingut lloc amb anterioritat al dia del sacrifici dels ratolins, que es va produir 15 dies després de l'electroporació.

L'estimulació del metabolisme mitocondrial produïda per l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 estaria causada per l'increment en l'activitat dels complexos I+III i III de la cadena de transport electrònic. Així, Mfn2 podria intervenir en la regulació de l'activitat d'aquests complexos en funció dels requeriments energètics cel·lulars, tot i que encara en desconeixem els mecanismes. Per altra banda, l'augment en l'expressió de les subunitats dels complexos IV i V, tot i no anar acompanyat d'un increment de la

seva activitat enzimàtica, podria ser un efecte secundari de la major activitat de la cadena de transport electrònic. En aquest sentit, ha estat postulada l'existència d'un reservori de complexos del sistema OXPHOS inactius a la membrana mitocondrial, la funció del qual seria mobilitzar-se en situacions de desajust (Faustin *et al.*, 2004; Benard i Rossignol, 2008). L'augment en l'activitat enzimàtica dels complexos I+III i III podria haver generat un enriquiment d'aquest *pool* de complexos inactius a la membrana mitocondrial per si han d'esser mobilitzats.

A continuació es mostra un esquema que resumeix els efectes de l'expressió de la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en múscul esquelètic (Figura 72).

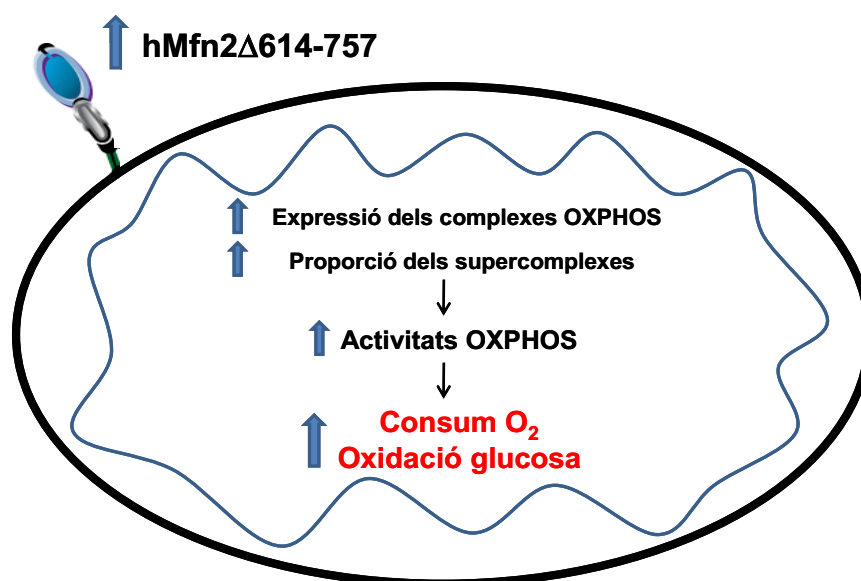


Figura 72. Model de l'estimulació del metabolisme mitocondrial en múscul esquelètic per l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757. L'expressió d'aquesta forma truncada de Mfn2, a través d'algun mecanisme que encara no coneixem, provoca una major activitat mitocondrial, augmentant l'expressió i l'activitat dels complexos de la cadena de transport d'electrons, així com la proporció de supercomplexes. Aquest augment de la capacitat del sistema OXPHOS es podria traduir en un increment de l'eficiència de la cadena respiratòria.

B) REPRESSIÓ DE MITOFUSINA 2

B.1) EFECTES SOBRE EL METABOLISME MITOCONDRIAL EN CÈL·LULES C2C12

Mitjançant la transducció de miotubs C2C12 amb un adenovirus que codifica 5 microRNAs específics contra la seqüència de Mfn2 de ratolí, s'aconseguí reprimir l'expressió de Mfn2 entre un 70 i un 80%, tant a nivell de proteïna com de mRNA.

També s'analitzà per WB l'expressió de la proteïna mitocondrial porina, no observant-se diferències i suggerint per tant, que la repressió de Mfn2 no altera la quantitat de mitocondris de les cèl·lules.

Per analitzar l'impacte de la repressió de Mfn2 sobre el metabolisme energètic cel·lular, es van dur a terme experiments de respirometria com els descrits en el cas de la sobreexpressió de hMfn2 Δ 614-757. Sorprenentment, els miotubs amb menor expressió de Mfn2 també presentaren un increment en el consum d'oxigen mitocondrial en situació de rutina, malgrat ser inferior a l'observat en els miotubs C2C12 que sobreexpressaven hMfn2 Δ 614-757, un 15% i un 25%, respectivament. En canvi, aquest augment en el consum d'oxigen no es traduí en un increment de la capacitat respiratòria màxima. Per altra banda, la inhibició del complex V amb oligomicina (Estat L), provocà un augment del 60% en el consum d'oxigen, fet no observat en els miotubs que sobreexpressaven hMfn2 Δ 614-757. Aquests resultats indiquen que les cèl·lules amb menor expressió de Mfn2 presenten un fort augment en la respiració no associada a la síntesi d'ATP (*proton leak*) respecte les cèl·lules control, fet que es corrobora en calcular la *Leak Flux Control Ratio* (L/E). Aquesta *ratio* ens diu que en els miotubs control la respiració no acoblada a la síntesi d'ATP representa aproximadament el 4% de la capacitat respiratòria màxima, mentre que en els miotubs amb disminució de l'expressió de Mfn2 aquest valor arriba al 7%.

Aquests resultats suggereixen que la repressió de Mfn2 provoca un major desacoblament de la cadena de transport d'electrons i la síntesi d'ATP, i per tant, una disminució de l'eficiència de la fosforilació oxidativa. Resultats similars han estat descrits en cèl·lules senescents (Hutter *et al.*, 2004), o de manera molt interessant, en fibroblasts de pacients de CMT2A amb determinades mutacions a Mfn2 (Loiseau *et al.*, 2007). Un increment en el *proton leak* portaria a una disminució en el potencial de membrana mitocondrial (Brand, 2000). La repressió de Mfn2 en els miotubs C2C12 anà acompanyada d'una caiguda significativa del 15% en el potencial de membrana mitocondrial, fet que podria ser una conseqüència directa del defecte en l'acoblament entre la cadena respiratòria i la síntesi d'ATP. Aquesta disminució del potencial de membrana mitocondrial ja havia estat observada en altres models cel·lulars, com les cèl·lules 10T1/2 *antisense* de Mfn2 (Bach *et al.*, 2003) i les cèl·lules MEF KO per Mfn2 (Liesa, 2008). La no afectació del *proton leak* en miotubs C2C12 que sobreexpressen

hMfn2Δ614-757 podria explicar que en aquest cas no s'observessin diferències en el potencial de membrana mitocondrial.

S'ha postulat que l'increment en la respiració no fosforilativa o *proton leak* es deu bàsicament a dues causes. La primera és un canvi en la composició de la membrana mitocondrial que la faria més permeable als protons (Else i Hulbert, 1987), i la segona, l'activació de les proteïnes desacoblants UCPs i del translocador de nucleòtids d'adenina ANT (Speakman *et al.*, 2004; Conley *et al.*, 2007). Una possible modificació en la composició de la membrana mitocondrial que podria alterar la permeabilitat d'aquesta és la peroxidació dels lípids provocada per les espècies reactives d'oxigen (ROS). És conegut que l'acumulació de ROS causa estrès oxidatiu, danyant els lípids i les proteïnes de la membrana mitocondrial interna (Kokoszka *et al.*, 2001; Stadlmann *et al.*, 2002). Resultats obtinguts en el nostre laboratori pel Dr. David Sebastián indiquen que la repressió de Mfn2 en cèl·lules musculars L6E9 incrementa la producció de H₂O₂. Així doncs, l'augment del *proton leak* observat en reprimir l'expressió de Mfn2 en miotubs C2C12 es podria explicar per un major dany oxidatiu de la membrana mitocondrial induït per l'increment de ROS. Això no exclou la possibilitat d'una major activitat de les UCPs, l'UCP3 en el cas concret de múscul esquelètic, o de l'ANT. De fet, s'ha demostrat que el superòxid, o algun producte del seu metabolisme, pot activar les UCPs, disminuint el potencial de membrana mitocondrial i per tant reduint la formació de més ROS (Echtay *et al.*, 2002; Bézaire *et al.*, 2007; Dietrich i Horvath, 2010). A més a més, recentment ha estat publicat que els defectes en l'acoblament mitocondrial descrits en fibroblasts de pacients de CMT2A van associats a un increment en l'expressió i l'activitat de l'ANT (Guillet *et al.*, 2010).

Per avaluar els efectes de la repressió de Mfn2 sobre el sistema OXPHOS, també s'analitzà l'expressió de diferents subunitats dels complexos de la cadena de transport electrònic. No es detectaren diferències estadísticament significatives ni a nivell proteic ni a nivell d'ARN missatger entre miotubs control i miotubs amb l'expressió de Mfn2 disminuïda. Així, les diferències observades en el consum d'oxigen entre miotubs control i miotubs on l'expressió de Mfn2 ha estat reprimida no semblen estar relacionades amb els nivells d'expressió dels complexos de la cadena respiratòria. En aquest cas, tampoc hem analitzat les activitats enzimàtiques per veure si existien diferències.

B.2) EFECTES SOBRE EL METABOLISME MITOCONDRIAL EN MÚSCUL ESQUELÈTIC

Per estudiar els efectes de la repressió de Mfn2 sobre el metabolisme mitocondrial en múscul esquelètic es varen generar dos models murins: un model de repressió transitòria de Mfn2 obtingut per electrotransferència d'ADN, i el model de repressió permanent de Mfn2 en múscul esquelètic (Mfn2 KO).

En el model de repressió transitòria, s'observà una disminució del 75% en els nivells proteics de Mfn2 en els músculs electroporats: tibialis anterior i gastrocnemi. Aquest model ha estat utilitzat per determinar els efectes de la repressió de Mfn2 en l'expressió i l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria.

Pel que fa a la generació del model de repressió permanent de Mfn2 en múscul esquelètic, hem obtingut un model diferent de l'esperat. Així, els ratolins Mfn2 KO presentaren una disminució del 80% de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic i en cor, però també una reducció d'aproximadament el 50% dels nivells d'aquesta proteïna en altres teixits com el cervell, el teixit adipós blanc i marró i el ronyó. Per tant, no es tracta d'un model *knockout* específic de múscul. Especulem que el promotor per a l'expressió de la Cre recombinasa utilitzat (Heidt i Black, 2005) fos específic de teixit muscular només en estat embrionari i no en el cas de l'animal adult. Malgrat aquest fet, vàrem portar a terme la fenotipació d'aquests animals, tot assumint que el fenotip observat no el podem relacionar únicament amb la repressió de Mfn2 en múscul esquelètic. Per altra banda, el fet que la caiguda de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic sigui molt similar a l'obtinguda en el model de repressió transitòria, 80% i 75%, respectivament, féu que utilitzéssim aquests músculs per realitzar estudis metabòlics *ex vivo*, com l'anàlisi d'oxidació de glucosa i els experiments de respirometria.

Per comprovar que els possibles efectes produïts per la repressió de Mfn2 sobre el metabolisme mitocondrial no es deuen a una disminució de la quantitat de mitocondris, es dugueren a terme els mateixos anàlisis realitzats en la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757. No es detectaren canvis en l'expressió de la proteïna mitocondrial porina ni en el número de còpies d'ADN mitocondrial en cap dels dos models murins utilitzats. Aquests resultats són concordants amb un treball publicat recentment en què només s'observa una disminució en la quantitat d'ADN mitocondrial en els músculs del

ratolí doble KO de Mfn1 i Mfn2, però no en els *knockouts* simples de Mfn1 o Mfn2 (Chen *et al.*, 2010). Tampoc s'observaren diferències en la quantitat ni en la morfologia dels mitocondris del ratolí Mfn2 KO, visualitzats per microscopia electrònica de transmissió. Per últim, es mesurà l'activitat enzimàtica de la citrat sintasa en homogenats totals del múscul tibialis anterior, i tampoc s'observaren diferències entre els controls i els músculs amb menor expressió de Mfn2. Amb aquests resultats hem demostrat que la repressió de Mfn2 en múscul esquelètic no produeix canvis en la massa mitocondrial. El que no hem pogut avaluar encara, degut a les dificultats tècniques per visualitzar la xarxa mitocondrial en múscul esquelètic, és el grau de fusió d'aquests mitocondris. Sí que hem comprovat, en canvi, que la repressió de Mfn2 en múscul esquelètic disminueix l'expressió de les proteïnes de fissió Drp1 i Fis1, mentre que no modifica l'expressió de les altres proteïnes de fusió, Mfn1 i OPA1. Aquest podria ser un mecanisme compensatori per tal d'intentar mantenir l'equilibri entre els dos processos.

Quan vam dur a terme la fenotipació general del model KO de Mfn2 en condicions basals, en animals de 6 mesos d'edat, els ratolins Mfn2 KO no mostraren diferències estadísticament significatives respecte els ratolins control en cap dels paràmetres analitzats: pes corporal, test de tolerància a la glucosa, nivells d'insulina en plasma o coordinació motora. En canvi, en ser sotmesos a una dieta rica en greixos, els ratolins Mfn2 KO (de 6 mesos d'edat) mostraren una disminució de la tolerància a la glucosa respecte els controls, així com també nivells superiors d'insulina plasmàtica, suggerint una major resistència a la insulina. Per altra banda, ratolins Mfn2 KO d'un any d'edat alimentats amb dieta estàndard presentaren hiperinsulinèmia en dejuni, i nivells d'insulina en plasma superiors als controls després de l'administració de glucosa, tot i que el perfil d'absorció de glucosa fou similar al dels ratolins control. Aquests resultats indiquen que la disminució de l'expressió de Mfn2 en ratolins adults provoca una major susceptibilitat a desenvolupar resistència a la insulina en resposta a l'envelliment o a una dieta rica en greixos. En aquest sentit, resultats obtinguts en el nostre laboratori demostren, tant en el model cel·lular muscular de rata L6E9 com en múscul esquelètic de ratolí, que la repressió de Mfn2 altera la via de senyalització d'insulina, disminuint la fosforilació d'Akt induïda per insulina (Dr. David Sebastián, resultats no publicats). Per altra banda, l'acumulació de lípids en múscul esquelètic és una característica important de la resistència a la insulina (Perseghin *et al.*, 1999). En aquest sentit, cèl·lules L6E9 amb l'expressió de Mfn2 reprimida presenten una major concentració de lípids que les

cèl·lules control (Dr. David Sebastián, resultats no publicats). Actualment, en el nostre laboratori s'està determinant la concentració i el tipus de lípids presents en els músculs dels ratolins Mfn2 KO.

Per estudiar els efectes de la repressió de Mfn2 sobre el metabolisme mitocondrial de múscul esquelètic, es van realitzar diferents experiments *ex vivo* en aquest teixit. Es va mesurar l'oxidació de glucosa en soleus de ratolins control i ratolins Mfn2 KO. La repressió de Mfn2 en múscul esquelètic provocà una disminució del 20% en l'oxidació de glucosa respecte els controls, confirmant els resultats obtinguts prèviament en el model cel·lular L6E9 (Pich *et al.*, 2005). A més, aquests resultats van en sentit oposat als obtinguts en aquesta tesi en sobreexpressar la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 en múscul esquelètic, on s'observà un increment del 50% en l'oxidació de glucosa. Aquest fet suggereix que la modulació de l'expressió de Mfn2 pot ser important en l'activitat metabòlica mitocondrial.

També es mesurà la taxa de consum d'oxigen en fibres musculars permeabilitzades, seguint el mateix protocol que en el cas de l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757. Les fibres dels músculs dels ratolins Mfn2 KO presentaren una disminució significativa de la *Respiratory Control Ratio* (RCR) utilitzant glutamat i malat com a substrats. Aquest fet indica que la respiració estimulada per ADP és menor que en els músculs dels ratolins control, i també va en sentit oposat als resultats obtinguts en la sobreexpressió de la forma truncada, on es produí un augment de la RCR. Aquests resultats, juntament amb els obtinguts en els assajos d'oxidació de glucosa, suggereixen que els músculs dels ratolins Mfn2 KO són metabòlicament menys actius. La menor estimulació per part de l'ADP del consum d'oxigen pot ser deguda a una menor activitat de la cadena respiratòria mitocondrial i/o a un major desacoblament entre la cadena de transport electrònic i la síntesi d'ATP. Precisament aquesta última opció hem demostrat que té lloc en el model cel·lular C2C12, i no descartem que també es pugui donar en múscul esquelètic. En aquest sentit, hagués estat interessant determinar el potencial de membrana mitocondrial en les fibres permeabilitzades, però les eines de què disposàvem no ho permetien. La capacitat respiratòria màxima, en canvi, no es veié alterada en les fibres musculars permeabilitzades dels ratolins Mfn2 KO com tampoc passava en sobreexpressar la forma hMfn2 Δ 614-757. Es va calcular la *Succinate Control Ratio* (SCR), que és el quocient entre la respiració obtinguda amb substrats pels complexos I + II i el consum d'oxigen amb substrats pel complex I. L'estimulació de la

respiració en addicionar succinat tendí a augmentar en els ratolins Mfn2 KO, suggerint la possible existència d'un mecanisme compensatori en el que hi podria estar involucrat el complex II.

Per estudiar si la menor activitat metabòlica observada en els músculs amb l'expressió de Mfn2 reprimida era causada per disfuncions en la cadena de transport electrònic, vam analitzar l'activitat enzimàtica de tots els complexos del sistema OXPHOS en homogenats de tibialis anterior del model murí de repressió transitòria de Mfn2. Els músculs amb menor expressió de Mfn2 mostraren una disminució del 20% en l'activitat del complex IV així com un lleuger increment en l'activitat dels complexos II + III respecte els músculs control. Aquestes diferències podrien explicar tant la disminució de l'oxidació de glucosa i de la respiració activada per ADP, com el lleuger augment en la SCR en els experiments de respirometria. Resultats similars han estat observats en el model Mfn2 KO específic de cerebel (Chen *et al.*, 2007). Per comprovar si les diferències en les activitats enzimàtiques eren degudes a canvis en l'expressió dels complexos, s'analitzaren per *Western Blot* els nivells d'algunes de les subunitats dels complexos de la cadena de transport electrònic. Els ratolins amb menor expressió de Mfn2 mostraren una reducció important en l'expressió proteica de la subunitat CoxIV del complex IV. Aquest fet correlaciona amb la disminució de l'activitat del complex IV observada en els músculs amb menor expressió de Mfn2. En canvi, com en el cas de la sobreexpressió de la forma truncada, no s'observaren diferències en els nivells d'ARN missatger de cap de les subunitats analitzades. Sorprenentment, els resultats obtinguts per BN-PAGE no mostraren una davallada en els nivells del complex IV. Aquest fet es podria explicar per una major eficiència d'extracció del complex IV per part de la digitonina en mitocondris provinents de músculs del model Mfn2 KO, suggerint l'existència de diferències en les propietats de la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial quan es reprimeix Mfn2. Per altra banda, s'observà un increment en la proporció dels supercomplexos I+III i I+III+IV en relació al monòmer del complex I, com succeïa en músculs que expressaven la forma hMfn2 Δ 614-757, però sense anar acompanyat d'un increment en les activitats dels complexos I+III i III.

La fluïdesa de les membranes mitocondrials associada a la seva composició lipídica és determinant per mantenir el correcte funcionament del sistema OXPHOS (Benard i Rossignol, 2008). La disminució en l'expressió de Mfn2 podria modificar la fluïdesa de les membranes mitocondrials, com succeeix quan es modula l'expressió d'altres

proteïnes implicades en dinàmica com Drp1 (Benard *et al.*, 2007). En aquest estudi s'ha demostrat que la repressió de Drp1 augmenta la fluïdesa de les membranes mitocondrials, fet que comporta una menor eficiència del sistema OXPHOS. Els fosfolípids de les membranes mitocondrials determinen la seva fluïdesa i participen en l'estabilització de les proteïnes de membrana. En aquest sentit, un dels més estudiats és la cardiolipina (CL). Es localitza principalment a la membrana mitocondrial interna, tot i que entre un 10 i un 20% del total es troba també a la membrana mitocondrial externa, concretament als punts de contacte entre les dues membranes i possibles llocs de fusió mitocondrial, zones on Mfn2 és particularment abundant (Liu *et al.*, 2003). La cardiolipina és important per una fosforilació oxidativa eficient, ja que la disminució del seu contingut, alteracions en la composició dels grups acil i/o la seva peroxidació han estat associades a una disminució de l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria (Chicco i Sparagna, 2007). A més, hi ha evidències que la cardiolipina estabilitza tant els complexos com el supercomplexos de la cadena respiratòria (Claypool *et al.*, 2008). La via per la que creiem que la repressió de Mfn2 afectaria l'estabilitat de la cardiolipina present a la membrana mitocondrial és la producció de ROS. Resultats obtinguts en el nostre laboratori pel Dr. David Sebastián tant en cèl·lules L6E9, on l'expressió de Mfn2 ha estat reprimida, com en múscul esquelètic del ratolí Mfn2 KO indiquen que ambdós models presentaren una producció incrementada de H₂O₂ respecte als corresponents controls. Pel que fa al model animal, la major producció de ROS s'observà tant en ratolins joves sotmesos a una dieta estàndard, com en animals alimentats amb una dieta rica en greixos. Així, seria plausible pensar que l'augment de ROS observat en reprimir Mfn2 provocaria la peroxidació de la cardiolipina, fet que a la vegada desestabilitzaria els complexos de la cadena de transport d'electrons, disminuint-ne l'activitat. Aquesta possibilitat aniria en la mateixa direcció que l'augment del *proton leak* observat en miotubs C2C12 amb l'expressió de Mfn2 reprimida i que ja ha estat discutit prèviament.

La disfunció mitocondrial en múscul esquelètic ha estat implicada en la resistència a la insulina i el desenvolupament de la diabetis de tipus 2 (Petersen *et al.*, 2004). El que no queda clar és si aquesta disfunció mitocondrial és causa o conseqüència de la resistència a la insulina, existint models animals que recolzen una o altra opció (Bonnard *et al.*, 2008; Dumas *et al.*, 2009). En el nostre model, es detecten alteracions en la funció mitocondrial del múscul esquelètic dels ratolins Mfn2 KO en condicions basals, quan aquests animals encara no mostren signes de resistència a la insulina.

Aquesta només ha estat observada en individus d'un any, o bé alimentats amb una dieta rica en greixos. Això fa pensar que la disfunció mitocondrial fa que els ratolins Mfn2 KO siguin més susceptibles a desenvolupar resistència a la insulina en envellir o en ser sotmesos a una dieta rica en greixos.

També ha estat descrit que l'augment de ROS i per tant, l'estrès oxidatiu, causa resistència a la insulina i inhibeix la senyalització d'Akt induïda per insulina (Houstis *et al.*, 2006). La nostra hipòtesi és que els ratolins Mfn2 KO presenten més estrès oxidatiu, que comportaria l'activació de JNK (resultats del Dr. David Sebastián), produint-se una major resistència a la insulina. A la vegada, aquest increment de ROS provocaria dany oxidatiu a les proteïnes i lípids de la membrana mitocondrial, en especial a la cardiolipina, alterant l'activitat dels complexos OXPHOS i per tant, accentuant la disfunció mitocondrial, com s'ha descrit en altres models (Paradies *et al.*, 2004). La nostra hipòtesi es veu recolzada per un estudi publicat recentment per Li i col·laboradors (Li *et al.*, 2010). En aquest treball, la sobreexpressió d'ALCAT1 en cèl·lules C2C12 produeix efectes similars als observats en reprimir Mfn2, com l'augment del *proton leak* i de la producció de ROS, i la disminució de la fosforilació d'Akt induïda per insulina. ALCAT1 és una aciltransferasa que participa en la remodelació de la cardiolipina, fent-la més sensible al dany oxidatiu provocat per ROS. En aquest mateix estudi, s'ha demostrat que els ratolins deficientes en ALCAT1 presenten una major sensibilitat a la insulina, al contrari del que succeeix en el cas de la deficiència de Mfn2. Amb tot, aquests resultats reforcen la relació existent entre l'estrès oxidatiu, la disfunció mitocondrial i la resistència a la insulina.

A continuació es mostra un esquema que resumeix els efectes de la repressió de Mfn2 en múscul esquelètic, i la hipòtesi proposada a través de la qual aquesta disminució de Mfn2 incrementaria la susceptibilitat a desenvolupar resistència a la insulina en determinades condicions (Figura 73).

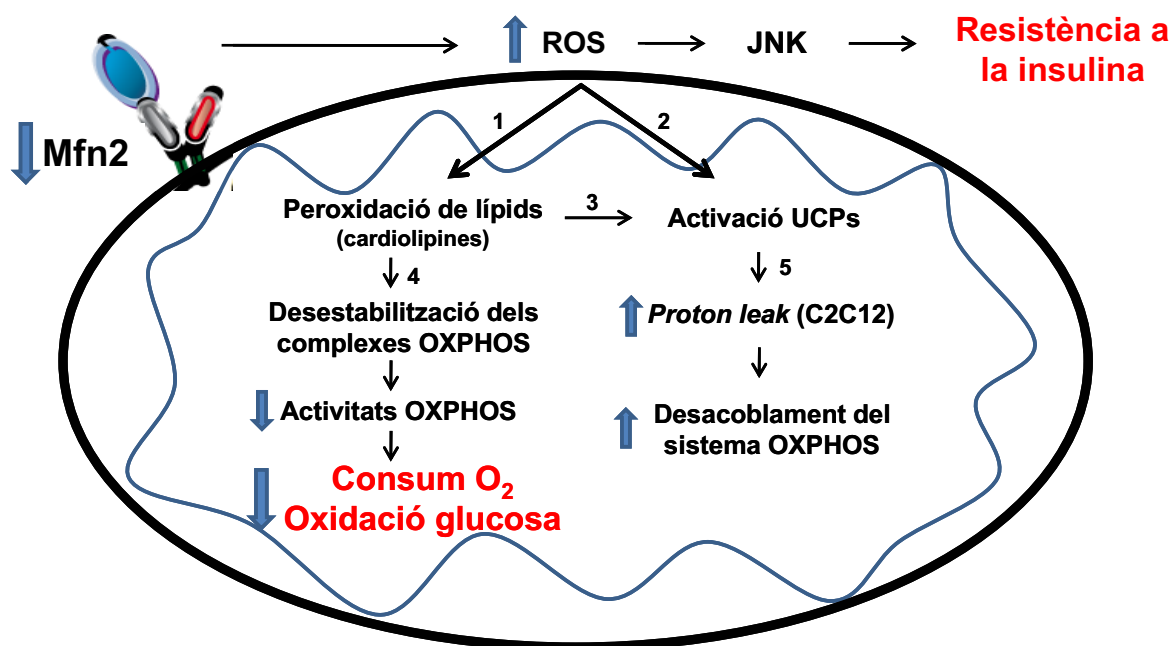


Figura 73. Augment de la susceptibilitat a desenvolupar resistència a la insulina degut a la repressió de Mfn2. En el model proposat, la repressió de Mfn2 en múscul esquelètic provoca un augment en la producció de ROS, que per una banda activa JNK i per l'altra oxida els lípids de la membrana mitocondrial i incrementa l'activitat de les UCPs. Aquest fet comportaria una disfunció mitocondrial, caracteritzada per una desestabilització i disminució de l'activitat dels complexos de la cadena respiratòria, i per un augment del *proton leak*. Tant l'activació de la JNK com la disfunció mitocondrial donarien lloc a una major susceptibilitat a desenvolupar resistència a la insulina. 1, 2, 3, 4 i 5 són respectivament: Stadlmann *et al.*, 2002; Echtay *et al.*, 2002; Bézaire *et al.*, 2007; Chicco i Sparagna, 2007; Speakman *et al.*, 2004.

CONCLUSIONS

1- La sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 estimula el metabolisme mitocondrial. Aquest fet queda demostrat per l'increment en el consum d'oxigen detectat en miotubs C2C12, així com per l'augment tant de l'estimulació de la respiració induïda per l'ADP, com de la taxa d'oxidació de glucosa observats en múscul esquelètic. Aquests efectes no són deguts a un augment de la massa mitocondrial.

2- L'estimulació del metabolisme mitocondrial en múscul esquelètic induïda per la forma hMfn2 Δ 614-757 està provocada per un increment en l'activitat dels complexos I+III i III, que creiem està relacionada amb una major proporció dels supercomplexes I+III i I+III+IV. Això suggereix que l'expressió de hMfn2 Δ 614-757 incrementa l'eficiència de la cadena respiratòria mitocondrial.

3- La repressió de Mfn2 en miotubs C2C12 causa un fort augment en la respiració no associada a la síntesi d'ATP o *proton leak*, i una disminució del potencial de membrana mitocondrial. Aquests resultats indiquen que la repressió de Mfn2 provoca el desacoblament de la cadena de transport d'electrons i la síntesi d'ATP, i que per tant, podria disminuir l'eficiència de la fosforilació oxidativa. L'augment en el *proton leak* podria està relacionat amb l'increment en la producció de ROS observat en miotubs amb l'expressió de Mfn2 disminuïda.

4- Tant la taxa d'oxidació de glucosa com l'estimulació de la respiració per part de l'ADP es troben disminuïdes en múscul esquelètic dels ratolins Mfn2 KO. A més, la repressió de Mfn2 en múscul esquelètic disminueix l'activitat del complex IV així com l'expressió de la subunitat CoxIV d'aquest mateix complex. Aquests resultats suggereixen que la disminució de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic causa una disfunció en el sistema de transport d'electrons. Aquests efectes són independents de canvis en la massa mitocondrial.

5- Els ratolins Mfn2 KO presenten una major susceptibilitat a desenvolupar resistència a la insulina en resposta a l'envelliment o a una dieta rica en greixos. La disfunció mitocondrial i l'augment de la producció de ROS observats en els músculs d'aquests ratolins podrien explicar aquesta major susceptibilitat.

MATERIALS I MÈTODES

A) CULTIUS CEL·LULARS

La manipulació de cèl·lules en cultiu s'ha realitzat en les condicions habituals d'esterilitat per tal de minimitzar el risc de contaminació. Els contaminants més comuns són bacteris, micoplasmes i fongs, que afecten a la integritat cel·lular podent-ne alterar també la seva fisiologia. Així, en tot moment s'ha treballat en campanes de flux laminar i utilitzant tots els reactius i materials estèrils. Segons la naturalesa dels materials s'han utilitzat diferents mètodes d'esterilització: filtració mitjançant filtres de 0,22 µm de diàmetre de porus, autoclau (120°C durant 20 minuts), irradiació amb rajos U.V... El material fungible necessari (plaques i flascons de cultiu, pipetes, tubs de centrífuga, etc.) així com la majoria de solucions utilitzades (medis, sèrum...) ja s'han adquirit estèrils.

A.1) LÍNIES CEL·LULARS I MEDIS DE CULTIU

A.1.1) Línies cel·lulars

Els dos tipus cel·lulars emprats en aquesta tesi, HEK293 i C2C12, són línies cel·lulars immortalitzades que creixen adherides en plaques o flascons de cultiu. En els dos casos les cèl·lules han estat crescudes a una temperatura de 37°C, un 90% d'humitat relativa i una atmosfera del 5% de CO₂ per mantenir el pH del medi. L'incubador utilitzat ha estat el *Model 3121, Forma Series II, Water Jacketed CO₂ Incubator, HEPA class 100 filter* (Thermo Electron Corporation).

- **HEK 293:** línia cel·lular procedent d'epiteli de ronyó humà. Aquestes cèl·lules van ser originàriament transformades amb ADN provinent d'adenovirus de tipus 5 (Ad5) per Graham i col·laboradors (Graham *et al.*, 1977). Degut a aquest fet, les cèl·lules HEK expressen la regió E1 (*early region 1*) dels adenovirus Ad5, que permet que aquests puguin completar el seu cicle lític a l'interior de les cèl·lules. Això fa que les cèl·lules HEK siguin especialment utilitzades per a l'amplificació i titulació d'adenovirus recombinants. En aquesta tesi doctoral s'ha emprat el clon HEK293A (Invitrogen).

- **C2C12:** cèl·lules generades per Blau i col·laboradors (Blau *et al.*, 1985) a partir de mioblasts C2 de ratolí obtinguts per Yaffe i Saxel (Yaffe i Saxel, 1977). Estan disponibles a l'ATCC (*American Type Culture Collection*). Tenen la capacitat de diferenciar a cèl·lules musculars o miotubs multinucleats. La diferenciació de les C2C12

és força ràpida, a dia 2 de diferenciació ja es poden observar miotubs, i en alguns experiments fins i tot es pot donar contracció espontània de les cèl·lules musculars ja diferenciades.

A.1.2) Medis de cultiu

El medi de cultiu base utilitzat en aquesta tesi doctoral ha estat el DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*; de la casa comercial Gibco) amb 25 mM de glucosa i L-glutamina. A partir d'aquest medi s'ha preparat el medi de creixement i el medi de diferenciació.

El medi de creixement, utilitzat tant per les cèl·lules HEK com per les C2C12, es prepara suplementant el medi base amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS; de Gibco), 25 mM de HEPES (Panreac) i els antibiòtics penicil·lina i estreptomicina (ambdós adquirits a Gibco) a una concentració de 100 U/ml i 100 µg/ml, respectivament. El sèrum fetal boví proporciona al medi tots els factors de creixement i altres molècules necessàries per a la proliferació cel·lular, mentre que l'HEPES proporciona un sistema de tamponament addicional al 5% de CO₂.

El medi de diferenciació per les cèl·lules C2C12 s'obté suplementant el medi base amb HEPES i els mateixos antibiòtics, però amb un 5% de sèrum de cavall (Gibco) enlloc del 10% de FBS.

A.1.2.1) Preparació dels medis de cultiu

El medi DMEM ha estat adquirit en ampolles de 500 ml i emmagatzemat sempre a 4°C. Un cop suplementat, es manté com a màxim un mes a aquesta temperatura.

El sèrum fetal boví s'adquireix també en ampolles de 500 ml que es guarden a una temperatura de -20°C. El sèrum ha de ser inactivat a 56°C durant 30 minuts abans de la seva utilització. Es fan alíquotes de 45 ml que es poden emmagatzemar a -20°C, o a 4°C si es fan servir a curt termini (abans de 1 mes i mig). S'afegeixen 57,7 ml de FBS per ampolla de DMEM.

La solució *stock* de penicil·lina i estreptomicina es guarda a -20°C en alíquotes de 5,7ml. S'afegeix una alíquota per ampolla de medi DMEM suplementat amb FBS.

L'HEPES es prepara amb aigua miliQ a una concentració de 1,25 M, pH 7,4, i s'esterilitza amb filtres de 0,22 µm (Schleicher & Schuell). Es congela a -20°C en

alíquotes de 45 ml i les que estan en ús (2 mesos) es poden guardar a 4°C. S'afegeixen 11,6 ml per ampolla de medi DMEM suplementat amb FBS i antibiòtics.

El sèrum de cavall s'adquireix i s'emmagatzema de la mateixa manera que el sèrum fetal boví. Un cop inactivat a 56°C es guarda a -20°C, o a 4°C si s'ha d'utilitzar a curt termini. S'afegeixen 27,4 ml de sèrum per ampolla de medi DMEM suplementat amb els antibiòtics i l'HEPES.

A.2) TÈCNIQUES GENERALS DE CULTIUS CEL·LULARS

El treball amb línies cel·lulars comporta el seu manteniment i ampliació, i la seva conservació per congelació.

A.2.1) Subcultius de manteniment

En funció de les necessitats experimentals s'utilitzen plaques de diferent tamany. Es deixen créixer les cèl·lules en les condicions descrites a l'apartat A.1.1 fins que arriben aproximadament al 80 o 90% de confluència. En aquest punt, les cèl·lules es tracten amb una solució estèril de tripsina i EDTA en PBS (Gibco) amb la finalitat de realitzar subcultius. Aquest tractament de proteòlisi enzimàtica i de segrest del calci trenca i desestabilitza els components proteics de la matriu extracel·lular responsables de l'adhesió cèl·lula-placa i cèl·lula-cèl·lula, fet que permet obtenir les cèl·lules en suspensió i poder-les repartir o subcultivar en noves plaques. El protocol del tractament amb tripsina és el següent:

1- S'aspira el medi de creixement de la placa amb les cèl·lules adherides amb pipetes *pasteur* de vidre.

2- S'afegeix una solució de PBS pH 7,4 estèril, normalment amb un volum equivalent a la meitat del volum de medi emprat per créixer les cèl·lules. Aquest pas és molt important perquè l'elevat contingut proteic del sèrum fetal boví present en el medi pot reduir molt l'activitat proteolítica de la tripsina per inhibició competitiva.

3- S'aspira el PBS i s'afegeix la solució estèril de tripsina/EDTA en PBS, prèviament escalfada a 37°C (ja que es guarda a la nevera i a 4°C no és prou activa). Normalment, s'utilitza una desena part del volum del medi de cultiu emprat per créixer les cèl·lules (per exemple, per una placa amb una superfície de 56 cm² i 10 cm de diàmetre s'utilitzen 10 ml de medi de cultiu i per tant, s'afegiria 1 ml de solució de tripsina).

4- S'agita suaument la placa per repartir la tripsina. Es deixa incubar el temps necessari per desenganxar les cèl·lules de la placa (aproximadament 1 minut i mig en el cas dels tipus cel·lulars utilitzats en aquesta tesi).

5- S'afegeix medi de creixement fresc a la placa i es recullen les cèl·lules amb la pipeta procurant obtenir una suspensió cel·lular el més homogènia possible.

6- Es compten les cèl·lules presents en una alíquota d'aquesta suspensió amb la cambra de Neubauer (apartat A.2.3 de Materials i Mètodes) i es fan les dilucions corresponents amb medi de creixement per subcultivar les cèl·lules en noves plaques.

A.2.2) Congelació i descongelació de cèl·lules

Les línies cel·lulars es poden mantenir durant anys congelades en nitrogen líquid. És convenient mantenir *stocks* congelats de cèl·lules de les primeres subdivisions, atès que les cèl·lules tendeixen a envellir i a modificar les seves característiques en els successius subcultius. A més, és molt important mantenir sempre *stocks* de les línies cel·lulars que utilitzem per poder continuar els cultius en cas de contaminacions. Durant la congelació utilitzem DMSO estèril (Sigma) com a crioprotector, per evitar la formació de cristalls que puguin trencar les cèl·lules. El procés de congelació és el següent:

1- Es tracta amb tripsina una placa confluent de 56 cm² i s'obté la suspensió cel·lular tal com ha estat descrit a l'apartat anterior.

2- Es centrifuguen les cèl·lules durant 5 minuts a 1300 rpm i a temperatura ambient.

3- S'aspira el medi i es resuspenen suaument les cèl·lules en 5 ml de FBS amb DMSO estèril al 10% (v/v). És molt important mantenir la solució de DMSO freda ja que aquest compost és tòxic per les cèl·lules a temperatura ambient.

4- Es reparteix 1 ml de la suspensió cel·lular en cada criotub (Nunc) col·locat prèviament al tanc d'isopropanol a 4°C (StrataCooler). Aquests tancs, gràcies a l'isopropanol, permeten mantenir en fred les cèl·lules. És molt important anotar al criotub el tipus cel·lular, la data i el número de cops que s'han subcultivat les cèl·lules.

5- Es col·loca el tanc amb els criotubs al congelador de -80°C i es deixa tota la nit, facilitant-se la congelació gradual de les cèl·lules. El dia següent es poden treure els vials i guardar-los en un tanc de nitrogen líquid, on es conservaran les cèl·lules de manera òptima durant anys. També es poden conservar durant setmanes a -80°C.

La descongelació s'ha de fer ràpidament ja que el medi de congelació de les cèl·lules conté DMSO que, com s'ha esmentat anteriorment, és tòxic per les cèl·lules a temperatura ambient. El protocol de descongelació és el següent:

1- Es descongela parcialment el criotub durant 1-2 minuts en un bany a 37°C, deixant que quedi una part congelada surant.

2- Es recull el contingut del vial en un tub que conté 10ml de medi de creixement prèviament atemperat a 37°C.

3- Es centrifuga la suspensió cel·lular durant 5 minuts a 1300rpm i a temperatura ambient.

4- S'aspira el sobrenedant per eliminar les restes de DMSO que hi havia en el medi de congelació. Es resuspèn el precipitat cel·lular amb medi de creixement fresc, el volum del qual depèn de la superfície de la placa o flascó on es sembraran les cèl·lules. És recomanable que les cèl·lules descongelades ocupin un 50% o més de la superfície on es subcultiven.

A.2.3) Comptatge de cèl·lules amb la cambra de Neubauer

En alguns casos, com quan es volen transduir cultius cel·lulars amb un determinat nombre de virus per cèl·lula, és molt important conèixer el nombre exacte de cèl·lules que sembrem a l'hora de fer els subcultius. Les cèl·lules es compten utilitzant la cambra de Neubauer. El coneixement de la profunditat de la cambra (0,1 mm) i de la superfície de comptatge (1 mm²) ens permet calcular el nombre de cèl·lules per mil·lilitre de suspensió. El procediment és el següent:

1- Després de tractar les cèl·lules amb tripsina (apartat A.2.1 de Materials i Mètodes), s'agafen 10 µl de la suspensió cel·lular homogènia i es dipositen sense fer bombolles entre la cambra de Neubauer (*Neubauer improved* de Brand GmbH) i un cobreobjectes de 24x50mm (Menzel-Glaser).

2- Es visualitzen les cèl·lules amb un microscopi vertical de camp clar (Nikon Eclipse TS100) a 4x i 10x augments. La cambra de Neubauer consta de 4 quadrants d'1 x 1mm. Es compten el nombre total de cèl·lules que hi ha dins de cada quadrant i es fa la mitjana dels 4 valors.

3- Per obtenir el nombre de cèl·lules per mil·lilitre de la suspensió, es multiplica la mitjana dels 4 valors obtinguts per 10⁴.

A.2.4) Detecció de micoplasma en cultius cel·lulars

A diferència dels fongs o dels bacteris, el micoplasma és un contaminant biològic que no es pot veure al microscopi. Un comportament anormal de les cèl·lules (disminució de la taxa de duplicació, pèrdua d'adherència a la placa, disminució de l'eficiència de transfecció...) pot ser indicatiu de la presència de micoplasma. Durant aquesta tesi s'han realitzat controls periòdics per descartar la contaminació per micoplasma mitjançant el *EZ-PCR Mycoplasma Test Kit* (Biological Industries Co.). Aquest mètode consisteix en la detecció i amplificació per PCR d'un fragment del genoma del paràsit. Per dur a terme aquest control s'utilitza una mostra d'1 ml de medi de cultiu que hagi estat en contacte amb les cèl·lules durant unes 48 hores. En el cas que el resultat indiqui contaminació es descarten les cèl·lules.

A.3) TRANSDUCCIÓ DE CÈL·LULES C2C12 AMB ADENOVIRUS RECOMBINANTS

Els adenovirus recombinants han estat àmpliament utilitzats com a vectors d'expressió de gens en cèl·lules de mamífer, resultant particularment útils en els tipus cel·lulars en què és molt difícil la incorporació d'ADN exogen per transfecció, com succeeix en el cas de les cèl·lules C2C12. Els vectors adenovirals presenten una sèrie d'avantatges com a sistemes d'expressió: tenen un ampli espectre d'infecció, permetent infectar teixits o línies cel·lulars de diferent origen (ratolí, rata, humana,...), presenten baixa patogenicitat i una elevada eficiència d'infecció, i a més, l'ADN incorporat roman de forma episomal, reduint així el risc de mutagènesi de la cèl·lula infectada. Entre els principals inconvenients que presenten aquests vectors però, hi ha el fet que són altament immunogènics i que l'expressió del gen és transitòria.

En aquesta tesi s'han emprat adenovirus recombinants per sobreexpressar la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 (Adv-hMfn2 Δ) en cèl·lules C2C12 i per reprimir l'expressió de Mfn2 mitjançant microRNA específics (Adv-miRNA) en aquest mateix model cel·lular. Com a controls respectius s'han utilitzat adenovirus que codifiquen la proteïna GFP (Adv-GFP) o adenovirus que codifiquen 5 miRNAs control (Adv-miRCtrl, que no reconeixen cap seqüència dipositada en les bases de dades). Els adenovirus Adv-hMfn2 Δ i els Adv-miRNA, i els seus adenovirus control, han estat generats prèviament en el nostre laboratori pel Dr. José Carlos Paz i el Dr. Marc Liesa, respectivament (Paz,

2008; Liesa, 2008). Tot el treball realitzat amb adenovirus s'ha efectuat a la campana de flux laminar i en una sala amb nivell de bioseguretat 2.

A.3.1) Amplificació i titulació dels adenovirus

Els diferents adenovirus utilitzats en aquesta tesi doctoral, descrits a l'apartat anterior, han estat amplificats a partir d'un *stock* viral cru. Aquest és un *stock* de virus pur que només s'utilitzarà per amplificar i que s'emmagatzema a -80°C . El protocol descrit a continuació ha estat el seguit en tots els casos.

Per amplificar els adenovirus, s'afegeixen gota a gota 100 μl del *stock* viral cru corresponent a una placa de 56 cm^2 amb cèl·lules HEK293A al 90-95% de confluència, tot agitant la placa en cercles. Normalment, després de 24-48 hores ja hi ha un 90% de cèl·lules HEK293A que presenten efecte citopàtic (CPE), degut a la gran quantitat de virus que contenen. Les cèl·lules s'arrodoneixen i es desenganxen de la placa, formant unes estructures esfèriques refringents i agrupades entre si que suren. En aquest moment es recull tot el medi amb les cèl·lules en un tub de 15 ml. Tant si es recull massa d'hora (poc % de CPE) com massa tard, el nombre de virus obtingut en la preparació serà menor. Si es recull massa tard, hi haurà més lisi cel·lular i s'alliberaran més adenovirus al medi, que s'inactiven per dos motius; perquè són menys estables en el medi que en l'interior cel·lular i perquè s'inactiven a 37°C , la temperatura de creixement de les cèl·lules.

Per lisar la membrana cel·lular i alliberar els virus al medi es realitzen tres cicles de congelació/descongelació (-80°C durant 30 minuts/temperatura ambient durant 15 minuts). Un cop fet l'últim cicle, es centrifuga el lisat a 1300 rpm durant 15 minuts a temperatura ambient, separant les restes cel·lulars del sobrenedant amb els virus. Mitjançant aquesta amplificació, es poden obtenir quantitats de virus suficients per transduir diferents tipus de línies cel·lulars ($1-2 \times 10^8$ UT/ml o unitats transductores per mil·lilitre). En el cas que es necessiti una major quantitat de virus, per exemple si s'han de purificar per poder-los injectar a animals, a partir d'aquest primer sobrenedant es poden infectar 5 plaques de 145 cm^2 de cèl·lules HEK293A al 95% de confluència i repetir el mateix procediment. El sobrenedant amb els virus s'aliquota i es manté congelat a -80°C . Hi ha diversos mètodes per a la titulació d'adenovirus d'una preparació. En el cas d'aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat un *kit* comercial, l'*Adeno-X™ Rapid Titer Kit* de Clontech.

A.3.2) Diferenciació de cèl·lules C2C12 i transducció amb adenovirus

La transducció és dependent de l'expressió de la proteïna CAR (*Cocksackie-Adenovirus Receptor*) a la membrana plasmàtica de la cèl·lula. Per tant, la sensibilitat a la transducció pot ser diferent dependent del tipus cel·lular.

En el cas dels miotubs C2C12 la transducció amb els diferents adenovirus s'ha efectuat a 200 MOIs. La MOI (*Multiplicity of Infection*) es defineix com el nombre de partícules víriques que es requereixen per infectar una cèl·lula. S'escull el valor de MOI que produeix el percentatge de cèl·lules infectades més elevat sense afectar la viabilitat cel·lular. Aquest paràmetre varia en funció del tipus cel·lular i s'ha de determinar empíricament.

En aquesta tesi doctoral s'han volgut estudiar els efectes metabòlics produïts per la modulació de l'expressió de Mfn2 en cèl·lules C2C12 diferenciades. Així, la transducció s'ha realitzat el dia 3 de diferenciació, dia en què ja s'observen els primers miotubs, i els experiments s'han realitzat a les 48 hores de la transducció, és a dir, el dia 5 de diferenciació, quan ja s'observa una diferenciació completa de les cèl·lules (Figura 74).

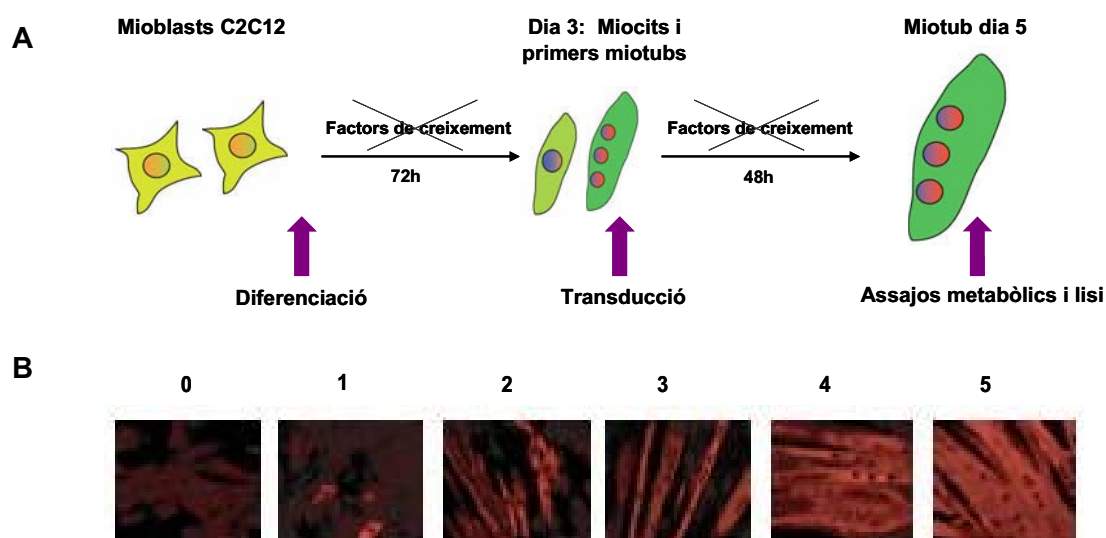


Figura 74. Procediment de diferenciació i transducció de cèl·lules C2C12. (A) Esquema del model de diferenciació i transducció de cèl·lules C2C12 utilitzat. (B) Immunocitoquímica de cèl·lules C2C12 realitzada a diferents dies de diferenciació (0, 1, 2, 3, 4 i 5) amb anticossos monoclonals de ratolí contra la proteïna *myosin heavy chain* (MHC) (Liesa, 2008). A dia 3 de diferenciació ja s'observen cèl·lules diferenciades i a dia 5 els miotubs estan completament diferenciats.

El protocol utilitzat en la diferenciació i transducció de les cèl·lules C2C12 ha estat el següent:

1- Es sembren les cèl·lules C2C12 a $2,5 \times 10^4$ mioblasts/cm². S'ha calculat empíricament que sembrant els mioblasts a aquesta concentració s'obté un cultiu subconfluent a punt per diferenciar en 24 hores.

2- Al cap de 24 hores, quan les cèl·lules estan aproximadament al 80% de confluència, es posen a diferenciar. Per fer-ho es canvia el medi de DMEM 10% FBS a DMEM 5% de sèrum de cavall.

3- El tercer dia de diferenciació s'aspira el medi i es renten les cèl·lules dos cops amb PBS.

4- S'afegeix medi de diferenciació nou a les plaques (2 ml per pou en les plaques de 6 pous).

5- S'afegeix el volum de la suspensió vírica corresponent a les MOIs a les que volem infectar directament al medi. Els virus, un cop descongelats es mantenen en gel en tot moment.

6- S'incuben les cèl·lules a 37°C durant 30 hores.

7- Es renten les cèl·lules 2 cops amb PBS i se'ls canvia el medi per medi de diferenciació lliure de virus. Es tornen a incubar les cèl·lules a 37°C durant 18 hores. En aquest punt es realitzen els experiments corresponents.

B) ESTUDIS METABÒLICS EN MIOTUBS C2C12

Cèl·lules C2C12 diferenciades, transduïdes amb l'Adv-Mfn2 Δ o amb l'Adv-miRNA contra Mfn2 (apartat A.3 de Materials i mètodes), han estat utilitzades en aquesta tesi doctoral per realitzar estudis de respirometria, mesura del potencial de membrana mitocondrial i de l'oxidació de palmitat (apartats B.1, B.2 i B.3), i avaluació dels nivells de proteïna i de mRNA missatger de diferents subunitats de la cadena de transport electrònic (apartats F.3 i G.4 de Materials i Mètodes, respectivament). En tots els casos, els mioblasts C2C12 s'han posat a diferenciar quan estaven al 80% de confluència i s'han transduït amb els adenovirus corresponents el dia 3 de diferenciació. Tots els experiments s'han efectuat el dia 5 de diferenciació, i en tots ells s'ha comprovat per *Western Blot* l'expressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 o la repressió de Mfn2 (apartat F.3 de Materials i Mètodes).

B.1) EXPERIMENTS DE RESPIROMETRIA

Per dur a terme els estudis de respirometria en cèl·lules C2C12 s'ha utilitzat el *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience). Aquest aparell consta de dos sensors òptics capaços de mesurar la concentració d'oxigen i de protons del medi extracel·lular. Aquest respiròmetre presenta múltiples avantatges respecte l'elèctrode d'oxigen de Clark: en primer lloc, permet la mesura del consum d'oxigen en cèl·lules adherides a la placa, sent particularment útil per l'anàlisi de cèl·lules diferenciades que perdrien la seva morfologia en ser tripsinitzades; en segon lloc, les mesures es realitzen en plaques de 24 pous, fet que permet dur a terme varies rèpliques en un mateix experiment; per últim, amb aquest instrument es pot mesurar simultàniament la taxa de consum d'oxigen (OCR) i la taxa d'acidificació del medi extracel·lular (ECAR). La OCR permet fer una estimació de la respiració mitocondrial. En tractar-se d'un mètode no invasiu, la mesura de l'OCR es pot fer repetides vegades al llarg del temps, fet que permet l'addició seqüencial a les cèl·lules de diferents compostos, com desacoblants o inhibidors de la cadena respiratòria.

B.1.1) Mesura de la taxa de consum d'oxigen (OCR)

En aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat un protocol basat en l'addició successiva de diferents compostos que permet analitzar la taxa de consum d'oxigen en diferents estats respiratoris (Figura 75):

- **Estat R** (rutina): taxa de consum d'oxigen per part de les cèl·lules a partir dels substrats proporcionats pel propi medi de cultiu. Depèn de la demanda energètica cel·lular i del grau d'acoblament entre respiració i síntesi d'ATP. És la situació més semblant a la fisiològica, ja que no s'afegeix cap desacoblant ni inhibidor de la cadena respiratòria.

- **Estat L** (*leak*): taxa de consum d'oxigen cel·lular obtinguda en inhibir el complex V de la cadena de transport electrònic amb oligomicina. Ens dona informació del consum d'oxigen no acoblat a la síntesi d'ATP.

- **Estat E**: taxa de consum d'oxigen cel·lular en desacoblar la cadena respiratòria de la síntesi d'ATP en addicionar FCCP. Aquest estat indica la capacitat màxima del sistema de transport d'electrons.

- **Estat rox** (*residual oxygen consumption*): taxa de consum d'oxigen no mitocondrial, estimada després d'afegir rotenona i antimicina A, inhibidors dels complexos I i III, respectivament. Si volem expressar les OCR obtingudes en els diferents estats com a consum d'oxigen mitocondrial, es resta la taxa de consum d'oxigen en estat rox dels valors anteriors.

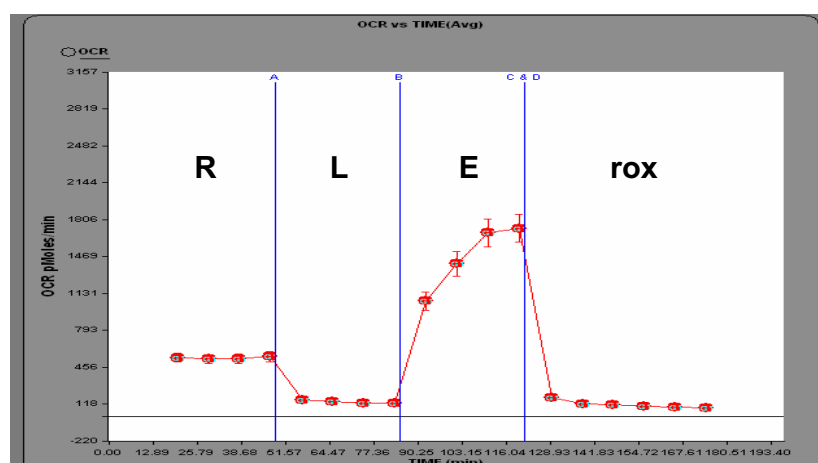


Figura 75. Exemple de la mesura de l'OCR en diferents estats respiratoris en cèl·lules. La línia vermella representa el consum d'oxigen expressat en pmol/min. Els punts són el número de mesures realitzades en cada estat i representen la mitja \pm es de les rèpliques efectuades. Les marques blaves verticals assenyalen el moment en què s'ha afegit cada compost (oligomicina, FCCP i rotenona + antimicina A, respectivament). R, L, E i rox són els diferents estats respiratoris descrits al text. L'eix vertical representa el consum d'oxigen i l'eix horitzontal el temps des que comença l'experiment.

A l'hora de dissenyar l'experiment s'ha de tenir en compte que el sistema només permet afegir 4 compostos i que aquests han de ser permeables a la membrana plasmàtica. El número òptim de cèl·lules a sembrar inicialment, la concentració adient dels inhibidors i la durada de les mesures depenen del tipus cel·lular, i s'han de determinar en experiments previs.

B.1.1.1) Protocol de respirometria

S'ha seguit el mateix protocol de respirometria tant en el cas de les cèl·lules C2C12 que sobreexpressen la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 com en les cèl·lules que presenten l'expressió de Mfn2 reprimida. Els diferents compostos addicionats durant el protocol han estat adquirits a Sigma.

1- Es sembren 15000 cèl·lules/pou en una placa de 24 pous (Seahorse Bioscience). És important que les plaques siguin de la mateixa casa comercial que l'aparell perquè són les úniques compatibles. S'han de deixar 4 pous sense cèl·lules, que serviran de control negatiu i de control de la temperatura durant l'experiment. S'incuben les cèl·lules a 37°C durant 16 hores.

2- El dia següent es posen a diferenciar les cèl·lules (apartat A.3.2 de Materials i Mètodes)

3- Es transdueixen les cèl·lules el tercer dia de diferenciació tal com s'explica a l'apartat A.3.2 de Materials i Mètodes. En cada sèrie d'experiments s'han transduït 10 pous amb l'adenovirus Adv-hMfn2 Δ o l'Adv-miRNA i 10 pous amb l'adenovirus control corresponent, Adv-GFP o Adv-miRCtrl, respectivament.

4- El dia abans de l'experiment de respirometria, dia 4 de diferenciació, es posa en marxa l'aparell i es programa el protocol que es vol utilitzar. És convenient engegar-lo el dia abans perquè triga unes hores a assolir la temperatura adequada. També es prepara la placa de calibració amb 1 ml/pou de líquid calibrador (Seahorse Bioscience). Aquesta placa, embolicada amb parafilm, es posa a una estufa a 37°C, on no es regulin els nivells de CO₂, durant 16 hores.

5- El dia de l'experiment es preparen les solucions 10X dels compostos a utilitzar (oligomicina, FCCP, rotenona i antimicina A) en el medi de mesura. Aquest medi és DMEM base (8,3g/L; Sigma) suplementat amb 5,5mM de glucosa, 2 mM de GlutaMax (Gibco) i els antibiòtics penicil·lina i estreptomicina (apartat A.1.2 de Materials i

Mètodes). S'ajusta el pH a 7,4 i es filtra. Aquest medi no porta bicarbonat ja que interferiria en la mesura de la concentració de protons.

6- Es canvia el medi de les cèl·lules per 675 µl de medi de mesura a cada pou i es deixa equilibrar la placa a 37°C i sense CO₂ durant 30-60 minuts.

7- La placa de calibració porta incorporat el sistema d'injecció de l'aparell, format per 4 ports per pou. En aquest sistema hi posem les solucions 10X dels diferents compostos, tenint present que l'ordre d'injecció és Port A, B, C i D:

Port A: 75 µl de la solució 10X d'oligomicina	Concentració _{final} al pou = 1 µg/ml
Port B: 75 µl de la solució 10X de FCCP	Concentració _{final} al pou = 0,3 µM
Port C: 75 µl de la solució 10X de rotenona	Concentració _{final} al pou = 0,1 µM
Port D: 75 µl de la solució 10X d'antimicina A	Concentració _{final} al pou = 0,1 µM

8- Es posa la placa de calibració al *XF24 Extracellular Flux Analyzer* i es calibren els sensors d'oxigen i de pH de l'aparell. Aquest procés de calibració dura 30 minuts aproximadament.

9- Quan acaba la calibració es canvia la placa de calibració per la placa amb les cèl·lules i s'inicia el protocol programat prèviament. Inicialment l'aparell fa 4 mesures corresponents a l'estat de rutina. Cada cicle de mesura consta de 4 minuts d'agitació, 2 minuts de repòs i 1 minut 30 segons de mesura. Seguidament, l'aparell injecta l'oligomicina (port A), fa 4 mesures, injecta el FCCP (port B) i torna a repetir els 4 cicles de mesures. Finalment, s'injecta la rotenona i l'antimicina A (ports C i D) i es realitzen 6 mesures més (Figura 75).

10- Un cop finalitzat el protocol, es treu la placa de l'aparell, es lisen les cèl·lules afegint a cada pou 50 µl de tampó de lisi (0,1M NaOH i 1% SDS) i es determina la concentració de proteïnes mitjançant el mètode de l'àcid bicinconínic (Pierce; apartat F.2 de Materials i Mètodes).

La taxa de consum d'oxigen en cada estat s'expressa com a pmol O₂/min·µg de proteïna. A partir d'aquests valors absoluts s'han calculat diferents *ratios* que ens donen informació sobre el grau d'acoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa (Hütter *et al.*, 2004; Gnaiger, 2007):

- **Uncoupling Control Ratio (UCR)**: és el quocient entre el consum d'oxigen en l'estat E i el consum d'oxigen en rutina (E/R) i expressa la capacitat respiratòria de reserva que tenen les cèl·lules. La inversa de l'UCR, R/E o **Routine Respiratory**

Control Ratio, indica el percentatge de la capacitat màxima que utilitzen les cèl·lules en l'estat respiratori de rutina.

- **Respiratory Control Ratio (RCR)**: és el quocient entre la respiració en l'estat E i l'estat de *leak* (E/L) i mesura el grau d'acoblament de la cadena de transport electrònic i la fosforilació oxidativa. La inversa del RCR, L/E o **Leak Respiratory Control Ratio**, indica el consum d'oxigen que no està lligat a la fosforilació oxidativa respecte la capacitat màxima, i que és degut majoritàriament al *proton leak*.

- **Phosphorylation Respiratory Control Ratio (RCR_p)**: és el quocient (R-L)/E i indica el percentatge de la capacitat respiratòria màxima que utilitzen les cèl·lules lligat a la producció d'ATP.

B.2) MESURA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Per quantificar el potencial de membrana mitocondrial de cèl·lules en cultiu es poden fer servir diferents tipus de sondes. En aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat la sonda catiónica TMRM (Invitrogen), que s'acumula als mitocondris en funció del seu potencial de membrana. En ser una sonda fluorescent (presenta una longitud d'ona d'excitació d'uns 540 nm i una longitud d'ona d'emissió d'uns 573 nm) la seva incorporació es pot detectar i quantificar mitjançant citometria de flux. Així, la intensitat de fluorescència detectada serà més gran com més elevat sigui el potencial de membrana mitocondrial.

Paral·lelament, per tal de validar les mesures, s'utilitza el desacoblant CCCP (Sigma) que dissipa el potencial de membrana mitocondrial i per tant, disminueix la incorporació de la sonda i els valors de fluorescència. Ens permet avaluar la fluorescència deguda a la unió no específica de la sonda.

Les solucions *stock* de la sonda TMRM i de CCCP es preparen en DMSO, a unes concentracions respectives de 500 µM i de 100 mM, i es guarden congelades a -20°C protegides de la llum.

Com que la determinació del potencial de membrana mitocondrial es realitza en cèl·lules C2C12 diferenciades, és important efectuar les incubacions de les cèl·lules amb la sonda en placa. Els volums que apareixen en el protocol són els corresponents a plaques de 6 pous. Segons el tipus cel·lular les concentracions utilitzades de sonda o desacoblant poden variar, així com també el medi d'incubació. El procediment és el següent:

1- A dia 5 de diferenciació es renten les cèl·lules amb PBS. S'afegeix 1 ml per pou de medi de diferenciació \pm CCCP a una concentració final de 30 μ M i s'incuben durant 30 minuts a 37°C. S'han fet sempre duplicats per cada condició.

2- S'aspira el medi, s'afegeix 1 ml per pou de medi de diferenciació + TMRM a una concentració final de 100 nM i es tornen a incubar durant 30 minuts a 37°C.

3- Es renten 2 cops les cèl·lules amb PBS per eliminar l'excés de sonda.

4- Es tripsinitzen les cèl·lules, es recullen en 500 μ l de medi DMEM i s'analitza la seva fluorescència al citòmetre de flux analitzador Coulter XL (Unitat de Citometria de Flux dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona).

La fluorescència detectada en els pous amb CCCP correspon a l'acumulació inespecífica de sonda en les membranes cel·lulars. Així, els valors de fluorescència de TMRM associats a la seva incorporació als mitocondris, en funció del potencial de membrana mitocondrial, són la diferència entre els valors de les mesures sense i amb CCCP.

B.3) MESURA DE L'OXIDACIÓ DE PALMITAT

Els experiments d'oxidació de palmitat s'han realitzat en miotubs C2C12, el dia 5 de diferenciació, transduïts amb un adenovirus control (Adv-GFP) o amb l'adenovirus que codifica la forma truncada hMfn2 Δ 614-757 (Adv-Mfn2 Δ). Aquests assajos s'han dut a terme en plaques de 6 pous.

El palmitat, com la resta d'àcids grassos, s'ha de conjuguar amb BSA abans d'afegir-lo al medi d'incubació, per tal que sigui soluble en medi aquós i accessible a les cèl·lules. El protocol de conjugació del palmitat amb BSA és el següent:

1- Es posen 500 μ l de U-¹⁴C-àcid palmític (Amersham) en un tub i es deixa evaporar l'etanol a la campana d'extracció en agitació constant.

2- S'afegeixen 6,97 mg d'àcid palmític no radioactiu i 1 ml de NaOH 0,1N.

3- S'escalfa la mescla a 80°C en una placa calefactora fins que la solució sigui transparent.

4- Paral·lelament, en un vas de precipitats de 25 ml es dissol 1 g de BSA lliure d'àcids grassos (Sigma) en 8 ml de NaCl 0,9% a 37°C.

5- Amb una pipeta d'1 ml s'afegeix, gota a gota, la solució de palmitat a la solució de BSA tot agitant contínuament a 37°C. Es deixa incubant a aquesta temperatura fins que la solució es torna totalment transparent.

6- Es filtra la solució de palmitat-BSA amb un filtre de 0,45 µm de diàmetre de porus.

7- Es fan alíquotes de 500 µl i es congelen a -20°C fins a la seva utilització.

Emprant les quantitats esmentades en aquest protocol, la solució preparada de palmitat conjugat assoleix una concentració de 2,5 mM. Aquesta serà la nostra solució *stock* 10X. Per altra banda, també es pot deixar preparada i alíquotada a -20°C la solució *stock* 10X de glucosa 25 mM + carnitina 8 mM, necessària per la preparació del medi d'oxidació.

El procediment d'oxidació de palmitat és el següent:

1- Es prepara el medi d'oxidació el mateix dia de l'experiment. Aquest medi conté palmitat conjugat amb BSA a una concentració de 0,25 mM, glucosa 2,5 mM i carnitina 0,8 mM en tampó KRBH (Taula 1) a pH 7,4. També es deixen preparades la solució A (tampó KRBH + 0,1% de BSA (p/v)) i la solució B (tampó KRBH + 1% de BSA (p/v)).

2- El dia 5 de diferenciació s'aspira el medi de les cèl·lules i es renten amb 1 ml de solució A per pou.

3- S'afegeix a cada pou 1 ml de solució B i s'incuben les cèl·lules 30 minuts a 37°C.

4- Durant aquesta incubació es preparen 2 trossos de parafilm (del tamany d'una placa de 6 pous) per cada placa. En un dels trossos es fan 6 forats petits amb bisturí al lloc que correspondria al centre de cada pou. Es col·loca a sobre de cada foradet un tros de paper Whatmann de 2 cm x 2 cm i a sobre el segon tros de parafilm, procurant apretar-los bé perquè no es mogui el paper Whatmann. S'afegeixen 150 µl de KOH 0,1M al paper Whatmann a través del forat del primer tros de parafilm.

5- Es fa un rentat de les cèl·lules amb 1 ml de solució A.

6- S'afegeixen 500 µl de medi d'oxidació a cada pou i es cobreix la placa amb el doble parafilm, amb la part oberta de cara a les cèl·lules, apretant bé al voltant dels pous perquè quedi ben ajustat i no s'escapi el CO₂. A sobre s'hi posa una pila de paper Whatmann i per últim la tapa de la placa.

7- S'incuben les plaques durant 3 hores a 37°C amb un pes a sobre.

8- Amb una xeringa i a través del parafilm, s'afegeixen 50 µl de HClO₄ 40% per pou i es cobreix amb un nou tros de parafilm, el paper Whatmann i la tapa. L'àcid perclòric atura la reacció d'oxidació i precipita el palmitat conjugat amb BSA que no ha estat oxidat.

9- Es deixa la placa 16 hores a temperatura ambient, amb el pes a sobre, per tal que el ¹⁴CO₂ format durant l'oxidació del palmitat quedi retingut al paper Whatmann.

10- Un cop acabada la incubació es transfereixen els quadrats de paper Whatmann en vials amb líquid de centelleig. S'agiten i es mesura la radioactivitat en el comptador beta Tri-Carb 2900TR (Packard) ubicat a la Instal·lació Radioactiva dels Serveis Científics del PCB.

11- Es recull el medi de cada pou en tubs eppendorf i es centrifuga durant 10 minuts a 13200 rpm i a temperatura ambient. Es transfereixen 300 µl del sobrenedant en vials amb líquid de centelleig, s'agiten i es mesura la radioactivitat en el comptador beta.

Tenint en compte les dpms totals del medi d'incubació, la concentració de palmitat en cada pou i les dpms en el paper Whatmann, corresponent al CO₂ atrapat, podem calcular la quantitat de palmitat que ha estat oxidat completament. La radioactivitat present en els 300 µl de sobrenedant analitzat és una mesura de l'oxidació incompleta del palmitat, ja que aquest sobrenedant conté productes intermedis de l'oxidació, els anomenats ASP (*acid-soluble products*). Els resultats s'expressen com a nmol de palmitat / 3 hores·mg de proteïna. Per poder expressar l'oxidació de palmitat per mg de proteïna es sembla una placa paral·lela de cèl·lules per estimar la concentració de proteïnes dels pous, ja que amb el BSA i el HClO₄ no és possible determinar-la en la mateixa placa de l'experiment.

En aquests experiments hem utilitzat 2 tipus de controls:

1- Control negatiu: es deixa un pou sense cèl·lules i es realitza tot el procediment exactament igual al descrit. La radioactivitat detectada en el paper Whatmann correspondrà a la pròpia descomposició del medi i el seu valor s'ha de substraure dels valors de dpm dels altres pous.

2- Control de difusió: en un dels pous de la placa no s'hi posa medi d'incubació. Si en el paper Whatmann corresponent es detecta radioactivitat és que hi ha hagut difusió provinent d'altres pous, i per tant l'experiment no és vàlid.

A		B		C	
Concentració final		KRBH (per 100 ml)		KRB 5X (per 500 ml)	
NaCl	135 mM	KRB 5X	20 ml	NaCl	19,72 g
KCl	3,6 mM	NaHCO ₃ 100 mM	2 ml	KCl	0,67 g
NaH ₂ PO ₄	0,5 mM	HEPES 1M pH 7,4	1 ml	NaH ₂ PO ₄	0,17 g
MgSO ₄	0,5 mM	H ₂ O miliQ	77 ml	MgSO ₄	0,25 g
CaCl ₂	1,5 mM			CaCl ₂	0,55 g
HEPES	10 mM			H ₂ O miliQ	Fins 500 ml
NaHCO ₃	2 mM				

Taula 1. Tampó KRBH: Krebs-Ringer bicarbonate Hepes buffer. (A) Composició final del tampó. El KRBH es prepara el mateix dia de l'experiment a partir de les solucions stock (B), que es filtren i es conserven a 4°C. (C) Composició del KRB 5X: conté CaCl₂ que s'ha de dissoldre per separat per tal que no precipiti.

C) MODELS ANIMALS

Durant la realització d'aquesta tesi doctoral s'han generat i emprat tres models murins diferents:

- 1- Model d'expressió transitòria de la forma truncada de Mfn2 (hMfn2 Δ 614-757) en múscul esquelètic
- 2- Model de repressió transitòria de Mfn2 mitjançant l'ús de microRNA específics en múscul esquelètic.
- 3- Model de repressió permanent de Mfn2 en múscul esquelètic (Mfn2 KO).

Els dos primers models han estat generats mitjançant la tècnica d'electrotransferència d'ADN. Els animals utilitzats han estat ratolins de la soca C57BL/6J proporcionats per l'empresa Harlan Ibèrica S.A.

El model KO de Mfn2 en múscul esquelètic s'ha obtingut a partir de creuaments entre ratolins Mfn2^{loxP/loxP} (Chen *et al.*, 2007), adquirits al MMRRC (*Mutant Mouse Regional Resource Centers*), i ratolins transgènics que expressen la Cre recombinasa sota el control d'una regió específica de múscul esquelètic del promotor de MEF2C (mef2C-73k-Cre; Heidt i Black, 2005).

Els animals s'han mantingut al Servei d'Experimentació Animal del Parc Científic de Barcelona (SEA-PCB), on han rebut condicions òptimes de temperatura (22°C), humitat i llum (cicles de llum-fosc de 12 hores) i han estat alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard. Tots els protocols utilitzats en aquesta tesi han estat aprovats pel Comitè d'Ètica i Experimentació Animal del Parc Científic de Barcelona.

C.1) GENERACIÓ DELS MODELS MURINS PER ELECTRO-TRANSFERÈNCIA D'ADN A MÚSCUL ESQUELÈTIC

L'electrotransferència és una tècnica que permet la introducció de material genètic (ADN) i altres substàncies (fàrmacs, metabòlits, anticossos, etc.) a les cèl·lules, i que ha estat àmpliament utilitzada per la transformació de bacteris i cèl·lules eucariotes *in vitro*. Aquesta tècnica consisteix en l'aplicació d'un camp elèctric a les cèl·lules, que provoca la permeabilització transitòria de la membrana plasmàtica i permet l'entrada de les molècules d'ADN a través dels porus formats.

Des de fa aproximadament 10 anys l'electrotransferència d'ADN també s'ha aplicat en diversos teixits *in vivo*, com tumors, pell, fetge, ronyó i molt especialment en múscul esquelètic (Aihara *et al.*, 1998; Mir *et al.*, 1999). L'electrotransferència d'ADN *in vivo* s'ha utilitzat amb diferents finalitats, des de l'estudi de la funció d'un gen determinat a finalitats biotecnològiques com la producció de proteïnes; la seva aplicació més coneguda, però, és la teràpia gènica (André i Mir, 2004).

El múscul esquelètic és una bona diana per l'electrotransferència d'ADN per diferents motius: primerament, perquè té un gran tamany i és fàcilment accessible; en segon lloc, la naturalesa postmitòtica de les fibres musculars (cèl·lules diferenciades i de llarga vida) permet una expressió del gen prolongada en el temps (setmanes o mesos); per últim cal tenir en compte el paper endocrí del múscul, ja que a més de gens amb funció a nivell local el múscul també és capaç d'expressar i secretar factors sistèmics com hormones, factors hematopoètics, anticossos o enzims. A més a més, diferents estudis demostren la possibilitat de repetir l'electrotransferència d'ADN al llarg del temps així com la possibilitat de coelectrotransferir fins a 3 plàsmids a les fibres musculars (Rizzuto *et al.*, 1999; Martel-Renoir *et al.*, 2003).

En aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat la tècnica de l'electrotransferència d'ADN en múscul esquelètic tant per generar un model que expressi la forma truncada de la proteïna Mfn2 (hMfn2 Δ 614-757), com per reprimir l'expressió de Mfn2 mitjançant l'ús de microRNAs. En ambdós casos s'han utilitzat ratolins mascles d'entre 8 i 10 setmanes d'edat, ja que s'ha comprovat que l'eficiència de transfecció és més gran en animals joves (Wells *et al.*, 1992; Danko *et al.*, 1997). Els músculs electroporats han estat el tibialis anterior, el gastrocnemi i el quàdriceps, ja que són fàcils d'injectar percutàniament i perquè els elèctrodes poden ser col·locats adequadament a ambdues bandes dels músculs.

C.1.1) Plàsmids utilitzats per a l'electrotransferència

C.1.1.1) Sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757

El cDNA d'aquesta forma truncada de Mfn2 humana ha estat clonat en el nostre laboratori per la Dra. Déborah Naon (Naon, 2009) en el vector pSP-CMVSV40, generat i cedit per la Dra. Fàtima Bosch de la Universitat Autònoma de Barcelona. Aquest vector conté el promotor fort CMV, un lloc de poliadenilació SV40 i un cassat de

resistència a ampicil·lina (Figura 76). S'ha utilitzat aquest plàsmid buit com a control negatiu en els experiments d'electrotransferència.

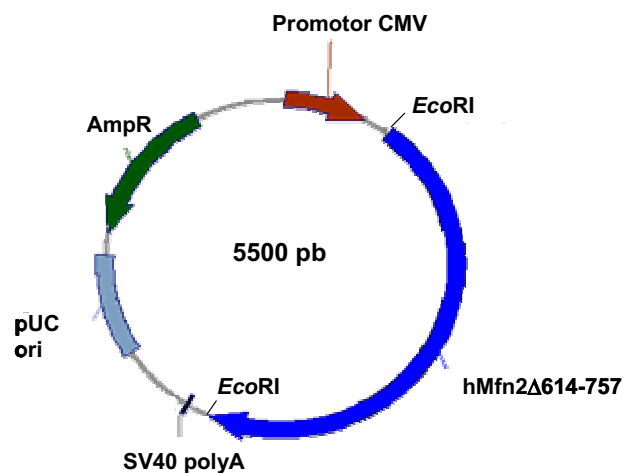


Figura 76. Mapa del constructe pSP-CMVSV40-hMfn2 Δ 614-757. El cDNA de la forma truncada de Mfn2 humana (hMfn2 Δ 614-757) va ser clonat al vector pSP-CMVSV40 en la diana *EcoRI*.

C.1.1.2) Repressió de Mfn2 mitjançant l'ús de microRNA

Els microRNA (miRNA) són seqüències d'ARN de 21-23 nucleòtids que hibriden amb els ARN missatgers bloquejant-ne la traducció i activant-ne la degradació. Els miRNA no es generen directament com a tal sinó que es transcriuen com a pri-miRNA (*primary* RNA) (Denli *et al.*, 2004). A diferència dels siRNA, que estan controlats per promotors de tipus pol III, els gens que codifiquen pels pri-miRNA estan controlats a nivell endogen per promotors de tipus pol II, que són més potents i poden ser teixit específics (Lee *et al.*, 2004). Aquest pri-miRNA consta d'un *hairpin* de 70 nucleòtids (on es troben els 21-23 nucleòtids del miRNA) i dues seqüències d'una sola cadena a 5' i a 3' (una seqüència *cap* i una cua poliA, respectivament). El pri-miRNA es forma i es processa al nucli per la ribonucleasa Drosha, donant lloc al pre-miRNA, que consta només del *hairpin* de 70 nucleòtids (Denli *et al.*, 2004). Un cop exportat al citoplasma, el pre-miRNA és processat per la ribonucleasa Dicer per formar els miRNA definitius de 21-23 nucleòtids.

Les construccions utilitzades en la repressió de la Mfn2 endògena han estat generades pel Dr. Marc Liesa (Liesa, 2008) al nostre laboratori a partir del vector d'expressió en mamífers pcDNA6.2 Gw/EmGFP/miR (Invitrogen), que codifica per un pri-miRNA sota el control del promotor CMV. Aquest pri-miRNA conté el cDNA de

l'EmGFP, que ens permet comprovar l'eficiència de la transfecció *in vivo* mitjançant l'*In Vivo Imaging System* (IVIS). A més a més, el vector presenta un cassat de resistència a espectinomicina i permet la clonació en tàndem de diferents miRNA. En el nostre cas, 5 miRNAs diferents contra Mfn2 varen ser clonats en tàndem en aquest vector (Figura 77).

Com a control negatiu en els experiments de repressió de Mfn2 s'ha utilitzat una construcció que conté 5 còpies en tàndem del miRCtrl (Invitrogen), que no reconeix cap seqüència dipositada en les bases de dades.

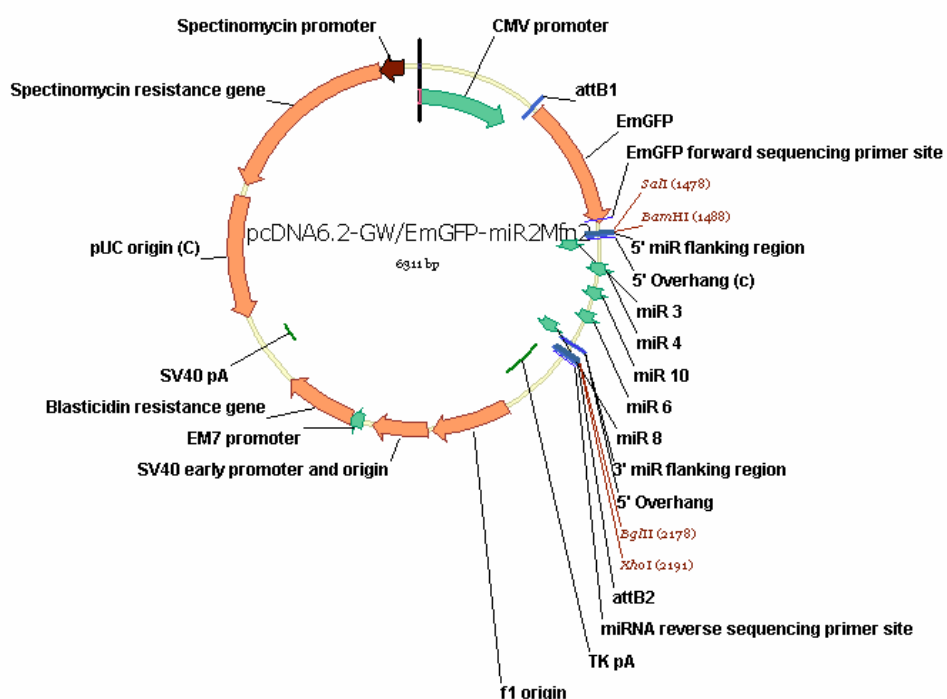


Figura 77. Mapa del constructe pcDNA6.2-Gw/EmGFP-miRNAMfn2. Els 5 miRNA contra Mfn2 estan indicats al mapa com a miR3, miR4, miR10, miR6 i miR8. La seva seqüència, així com la del miRCtrl es troben a la tesi del Dr. Marc Liesa (Liesa, 2008).

C.1.1.3) Amplificació i purificació dels plàsmids

Els plàsmids d'interès van ser utilitzats per transformar per xoc tèrmic bacteris competents de la soca XL1-Blue d'*E.coli* (apartat G.1.1 de Materials i Mètodes). Es van seleccionar les colònies transformants amb ampicil·lina (100 µg/ml) o espectinomicina (50 µg/ml) en plaques de LB. La purificació del plàsmid es va fer a partir d'1 litre de cultiu bacterià crescut en medi LB a 37°C durant 16 hores. Per fer-ho es va usar l'*EndoFree Plasmid Mega kit* (Qiagen) seguint les instruccions de la casa comercial.

Aquestes purificacions permeten l'obtenció de 2-5 mg d'ADN, important car les transfeccions de fibres musculars requereixen grans quantitats de plàsmid (50-100 µg per múscul). A més, el plàsmid purificat queda pràcticament lliure d'endotoxines, condició indispensable per poder realitzar l'electrotransferència *in vivo*. Aquests lipopolisacàrids, presents a les membranes de bacteris Gram negatius com *E.coli*, disminueixen l'eficiència de la transfecció, i si són injectats *in vivo* generen una resposta del sistema immunitari provocant a l'animal febre, activació de la cascada del complement, síndrome del *shock* tòxic...

Els plàsmids purificats són resuspesos en solució salina estèril (0,9% NaCl) i portats a una concentració final de 2 µg/µl. Els vectors es van verificar per digestió amb l'enzim *EcoRI* en el cas de l'expressió de la forma truncada de Mfn2, i per seqüenciació utilitzant l'encebador EmGFP f (Liesa, 2008) en el cas del constructe utilitzat per a la repressió de Mfn2 endògena.

C.1.2) Electrotransferència dels plàsmids al múscul esquelètic

C.1.2.1) Sobreexpressió de la forma hMfn2Δ614-757

Els experiments de sobreexpressió de la forma truncada de Mfn2 s'han realitzat en múltiples sèries de 8 ratolins cada una, 4 dels quals han estat electroporats amb el vector pSP-CMVSV40 (control negatiu) i 4 amb el vector pSP-CMVSV40-hMfn2Δ614-757. Els músculs electroporats han estat el tibialis anterior, el gastrocnemi i el quàdriceps.

C.1.2.2) Repressió de Mfn2

Els experiments de repressió de Mfn2 en múscul esquelètic han estat realitzats en 4 sèries de 5 ratolins cada una. En aquest cas només s'han electroporat els músculs tibialis anterior i gastrocnemi, ja que havíem comprovat que l'eficiència de transfecció era superior que en el cas dels quàdriceps. A tots els ratolins se'ls ha electroporat la pota esquerra amb el vector pcDNA6.2 Gw/EmGFP/miRCtrl (control negatiu) i la pota dreta amb el vector pcDNA6.2 Gw/EmGFP/miRNAMfn2. L'experiment s'ha plantejat d'aquesta manera per tal de minimitzar les diferències d'expressió de Mfn2 endògena entre ratolins.

C.1.2.3) Protocol d'electrotransferència d'ADN

1- S'anestésien els ratolins mitjançant una injecció intraperitoneal de ketamina / xilacina (100 i 10 mg/kg pes corporal, respectivament) diluïda en solució salina. Es subministra en un volum de 200-250 µl fent servir xeringues d'insulina amb agulla G30 (BD Micro-Fine™). El mateix tipus de xeringa i agulla seran també els utilitzats en passos posteriors.

2- Es rasuren les potes posteriors dels ratolins.

3- S'injecta hialuronidasa (Sigma) en solució salina als músculs que volem electroporar (10 unitats enzimàtiques/múscul). Aquest enzim degrada la matriu extracel·lular millorant l'eficiència de la transfecció sense causar dany tissular (McMahon *et al.*, 2001; Franckhauser *et al.*, 2008). El volum d'injecció és de 25-30 µl.

4- Es deixa actuar la hialuronidasa durant 1 hora.

5- S'injecta l'ADN plasmídic directament als músculs (60µg al tibialis anterior i 100µg al gastrocnemi i al quàdriceps). Es realitza en una única injecció de 30 µl en el cas del tibialis anterior, i de 50 µl en el gastrocnemi i el quàdriceps.

6- S'aplica un camp elèctric de 175 V/cm i 1 Hz de freqüència, amb 10 polsos de 20 mil·lisegons de durada cada un. L'aplicació local de polsos elèctrics després de la injecció d'ADN nu al múscul incrementa l'eficiència de la transfecció gènica, obtenint així una elevada expressió del gen d'interès. L'electroporador utilitzat per aplicar el camp elèctric al múscul ha estat el BTX ECM 830 *electroporator* (BTX).

7- Es tornen els animals a la gàbia i es deixen recuperar durant 3 o 4 dies.

C.1.3) Seguiment *in vivo* de l'eficiència de l'electrotransferència

En el cas de la repressió de Mfn2 s'ha pogut realitzar un seguiment *in vivo* de l'eficiència de l'electrotransferència dels constructes corresponents (apartat C.1.1.2), gràcies a la utilització de l'IVIS *Imaging System 200 Series* (Xenogen) (Figura 78). Aquest aparell és capaç de detectar bioluminescència i fluorescència en animals vius.

Com que el plàsmid electrotransferit també codifica la proteïna GFP, l'IVIS ens ha permès comprovar l'eficiència de l'electrotransferència i fer una estimació del dia en què el pic d'expressió del microRNA és màxim. A més, presenta l'avantatge que és un mètode gens invasiu. S'han pres imatges els dies 3, 5, 7, 10, 12 i 15 després de

l'electroporació, s'han seleccionat les regions d'interès per calcular la fluorescència emesa i s'ha optimitzat el temps en què la senyal és màxima.

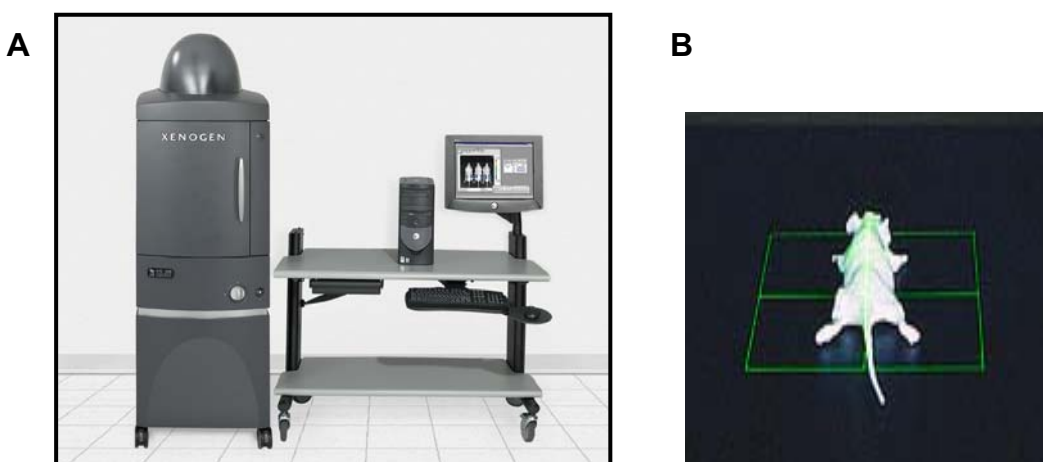


Figura 78. In Vivo Imaging System (IVIS). (A) Aparell de detecció de fluorescència connectat a un ordinador. Consta d'una cambra totalment opaca acoblada a una càmera CCD (*Charge Coupled Device*) altament sensible que es manté a una temperatura de -95°C . (B) Ratolí anestesiats amb isofluorà i col·locat a l'interior de la cambra.

C.2) GENERACIÓ DEL MODEL DE REPRESSIÓ PERMANENT DE MFN2 EN MÚSCUL ESQUELÈTIC (MFN2 KO)

Per generar el model de pèrdua de funció de Mfn2 en múscul esquelètic (Mfn2 KO) es van adquirir al MMRRC els ratolins homozigots $\text{Mfn2}^{\text{loxP/loxP}}$ generats per David Chan i col·laboradors (Chen *et al.*, 2007). Aquesta soca presenta 2 llocs de recombinació LoxP flanquejant l'exó que codifica el motiu G1 del domini GTPasa (exó 6) del gen de Mfn2. En presència de la recombinasa Cre s'escindeix aquest exó i es produeix un canvi de pauta de lectura que evita la formació de qualsevol proteïna funcional. Els ratolins $\text{Mfn2}^{\text{loxP/loxP}}$ presenten un *background* genètic mixt 129/Black Swiss i traces de C57BL/6.

Els ratolins $\text{Mfn2}^{\text{loxP/loxP}}$ es van creuar amb ratolins transgènics que expressen la recombinasa Cre en múscul esquelètic. La línia utilitzada fou la Mef2C-73k-Cre, generada per Black i col·laboradors (Heidt i Black, 2005), que expressa la Cre sota el control d'una regió *enhancer* del promotor de Mef2C específica de múscul esquelètic. Estudis previs demostraren que aquesta regió *enhancer* es troba altament conservada i que és suficient per promoure l'expressió exclusivament a múscul esquelètic (Wang *et al.*, 2001; Dodou *et al.*, 2003). En aquesta línia transgènica, la recombinasa Cre

s'expressa tant en fibres musculars de contracció ràpida com en fibres de contracció lenta, i des de les primeres etapes del desenvolupament del múscul esquelètic (Heidt i Black, 2005). Els ratolins Mef2C-73k-Cre van ser cedits per la Dra. Carme Caelles de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona previ consentiment del Dr. Brian Black.

Es van creuar 2 femelles Mfn2^{loxP/loxP} amb 1 mascle de la soca Mef2C-73k-Cre. D'aquesta manera s'obtingué una primera generació de ratolins heterozigots Mfn2^{+/loxP} i Cre⁺ o Cre⁻. Els heterozigots es varen creuar entre si per obtenir els ratolins Mfn2 KO (mef2C-Cre^{+/-} Mfn2^{loxP/loxP}). En els diferents experiments realitzats amb aquest model animal s'han utilitzat ratolins amb genotip mef2C-Cre^{-/-} Mfn2^{loxP/loxP} com a controls, i germans dels ratolins Mfn2 KO.

C.2.1) Comprovació dels ratolins Mfn2 KO per genotipació

La genotipació del model de ratolí KO de Mfn2 s'ha realitzat mitjançant PCR (apartat G.3) a partir d'ADN genòmic provinent de les cues dels ratolins.

C.2.1.1) Obtenció d'ADN genòmic a partir de cues de ratolí

Aquest protocol d'extracció d'ADN es basa en la digestió d'un tros de cua de 0,5 cm de longitud amb proteïnasa K i la posterior precipitació de l'ADN amb etanol. Les cues es tallen en el moment del deslletament dels ratolins i es guarden en tubs eppendorf a -20°C. El procediment següent és el següent:

1- Es prepara per cada mostra una mescla que contingui 490 µl de tampó de lisi i 10 µl de proteïnasa K, provinent d'una concentració de 20 mg/ml. La composició del tampó de lisi és: Tris-HCl 100 mM pH 8,5; NaCl 200 mM; SDS 0,2% (p/v) i EDTA 5mM.

2- S'afegeixen els 500 µl de la mescla a cada tub amb la cua corresponent i s'incuben a 56°C en agitació durant 16 hores.

3- Es centrifuguen els tubs 15 minuts a 13.200 rpm i es traspassa el sobrenedant a nous eppendorfs que contenen 500 µl d'isopropanol.

4- S'agiten els tubs per inversió fins que s'observa l'ADN en forma de precipitat blanc.

5- Es centrifuguen els tubs 3 minuts a 13.200 rpm i es descarta el sobrenedant.

6- S'afegeixen 500 µl d'etanol 70% al precipitat, s'agiten i es tornen a centrifugar 2 minuts a 13.200 rpm.

7- S'elimina el màxim de sobrenedant possible amb cura de no emportar-se el precipitat.

8- Es deixen evaporar les restes d'etanol a temperatura ambient amb els tubs oberts i es ressuspèn el pellet en 150-200 µl d'aigua miliQ o de tampó TE. L'ADN ressuspès es guarda a -20°C.

C.2.1.2) Genotipació

Per detectar la presència d'un dels llocs LoxP s'utilitzaren els oligonucleòtids HC106 i HC108 (Taula 2). Amb aquest parell d'encebadors s'amplifica una banda de 710 pb en el cas dels ratolins *wild-type* i una banda de 810 pb en el cas dels ratolins Mfn2^{loxP/loxP}. En els ratolins heterozigots es detecten les 2 bandes (Figura 79A).

També s'han genotipat els ratolins per detectar la presència de la Cre recombinasa amb el parell de *primers* corresponents (Taula 2). Així, la presència d'una banda d'uns 100 pb ens indica que els ratolins són Cre +, mentre que la seva absència ens indica que són Cre – (Figura 79B).

Encebadors	Seqüència
HC106	GAAGTAGGCAGTCTCCATCG
HC108	CCCAAGAAGAGCATGTGTGC
Cre forward	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
Cre reverse	GTGAAACAGCATTGCTGTCACCT

Taula 2. Seqüència dels encebadors utilitzats en la genotipació dels ratolins Mfn2 KO.

La reacció de PCR per a la genotipació dels ratolins s'ha dut a terme en un volum final de 50 µl. L'ADN polimerasa utilitzada ha estat la Taq polimerasa (Biotools). Per cada reacció s'han afegit 200 ng d'ADN, els encebadors corresponents a una concentració de 400 nM, els dNTPs a 0,2 mM i el tampó de la polimerasa (Biotools). El termociclador emprat ha estat el model 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

Les condicions de la PCR han estat les següents: un pas inicial de 5 minuts a 94°C, 35 cicles: desnaturalització (30 segons a 94°C), hibridació (1 minut) i elongació (1 minut a 72°C), i un pas final d'elongació d'un minut a 72°C. La temperatura d'hibridació ha estat de 58°C en el cas dels encebadors HC106 i HC108 i de 55°C pels

encebadors de la Cre recombinasa. El producte de PCR es visualitza després d'una electroforesi en un gel d'agarosa al 2% (apartat G.2).

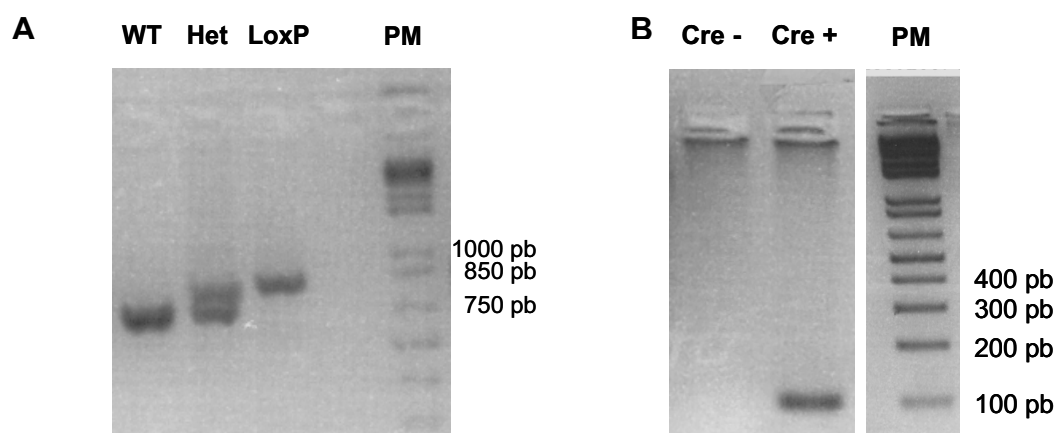


Figura 79. Genotipació del model KO de Mfn2. Electroforesi en gel d'agarosa al 2% dels productes d'amplificació de les PCR realitzades a partir d'ADN genòmic de la cua dels ratolins. **(A)** PCR realitzada amb els *primers* HC106 i HC108. PM: marcador de pes molecular. *WT*: *wild-type*. Het: heterozigot. LoxP: $Mfn2^{loxP/loxP}$. **(B)** PCR realitzada amb els oligonucleòtids *Cre forward* i *Cre reverse*. Cre + indica la presència de la recombinasa.

D) ESTUDIS *IN VIVO*

D.1) TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA (GTT)

El test de tolerància a la glucosa és una tècnica emprada per avaluar la capacitat d'absorció de glucosa que presenta un individu. Així doncs, la tècnica es basa en l'administració d'una càrrega de glucosa i en el seguiment de la seva aparició i desaparició a la sang al llarg del temps. En cas que es presenti resistència a la insulina s'arribarà a nivells de glucèmia en sang més elevats i es trigarà més temps a tornar a l'estat glucèmic basal.

Aquesta tècnica s'ha realitzat en el model d'expressió transitòria de la forma truncada de Mfn2 i en el KO de Mfn2. En el primer cas, el GTT es va efectuar una setmana després de l'electrotransferència d'ADN i en el segon, es va realitzar aquest test a les 12, a les 25 i a les 50 setmanes d'edat. En el cas del model *knockout* de Mfn2 també s'ha efectuat el GTT a animals sotmesos a una dieta rica en greixos (HFD). Així, animals de 10 setmanes d'edat van ser alimentats durant 15 setmanes amb una dieta estàndard o bé amb una dieta rica en greixos (el 10% o el 60% de calories, respectivament, prové dels greixos; D12451 i D12492 de Research Diets), i posteriorment se'ls realitzà el GTT.

Procediment:

El dia abans de realitzar el GTT es posen els animals en dejuni durant 16 hores.

1- Es realitza un petit tall a la cua de l'animal a través del que s'extreu una gota de sang i es mesura la glucèmia (temps 0) aplicant la gota a la tira del glucòmetre (Accu-Check).

2- S'injecta intraperitonealment a l'animal una solució de glucosa (20% (p/v) de glucosa en solució salina) a relació de 2 g glucosa / kg pes corporal.

3- Es recullen mostres de sang 5, 15, 30, 60, 90 i 120 minuts després de l'administració de la glucosa i es mesura la glucèmia amb el glucòmetre.

4- També s'obtenen, a cada temps, 50 µl de sang amb *microvettes* amb EDTA (Starstedt) per determinar posteriorment els nivells d'insulina en plasma.

5- La sang extreta es centrifuga a 2.000xg durant 20 minuts a 4°C, es recull el sobrenedant (plasma) i es congela a -20°C.

La concentració d'insulina en plasma es va determinar utilitzant l'*Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA kit* (CristalChem) seguint les indicacions de la casa comercial.

D.2) TEST DE TOLERÀNCIA A LA INSULINA (ITT)

El test de tolerància a la insulina s'ha realitzat en els ratolins Mfn2 KO d'un any d'edat per avaluar el grau de resistència a la insulina. El procediment és molt semblant al del GTT però administrant una injecció intraperitoneal d'insulina enlloc de glucosa. L'ITT s'ha efectuat en els ratolins després d'un dejuni de 4 hores. Es mesura la glucèmia al temps 0 amb el glucòmetre i seguidament s'injecten intraperitonealment 0,75 U d'insulina (Humalog) per kg. Es mesura la concentració de glucosa en sang als 15, 30, 45, 60, 75 i 90 minuts després de la injecció.

D.3) TEST DE COORDINACIÓ MOTORA

El test de coordinació motora s'ha realitzat en ratolins Mfn2 KO de 20-24 setmanes d'edat utilitzant el Rota-Rod/RS LE8200 (Panlab). El Rota-Rod consisteix en un eix de 3 cm de diàmetre, situat 15 cm per sobre de la base, que gira a una velocitat controlada i que està dividit per separadors, fet que permet avaluar la coordinació i l'equilibri de 3 ratolins simultàniament.

Abans de realitzar el test, els ratolins s'han de sotmetre a 2 sessions d'adaptació. En aquestes sessions, els ratolins es col·loquen sobre l'eix, que gira a una velocitat de 4 rpm, i s'hi han de mantenir almenys durant 1 minut. Aquest procediment es repeteix 3 vegades. Les 2 sessions d'adaptació tenen lloc en un interval de 5 dies i l'experiment s'efectua 3 dies després del segon dia d'adaptació.

El dia de l'experiment, els ratolins es col·loquen sobre l'eix, que es troba girant a una velocitat inicial de 4 rpm. Aquesta velocitat s'incrementa gradualment de 4 a 50 rpm en un període de 5 minuts. Es registra la velocitat exacta a la que cauen els ratolins i el temps, mesurat en segons, que s'han mantingut sobre l'eix.

E) ESTUDIS *EX VIVO* DE LA FUNCIO I EL METABOLISME MITOCONDRIAL EN MÚSCUL ESQUELÈTIC

L'anàlisi de la funció mitocondrial s'ha convertit en una part essencial de la recerca bàsica en el camp de la fisiologia mitocondrial, així com també en el diagnòstic de diverses malalties. La correcta mesura de la fosforilació oxidativa mitocondrial és clau en l'estudi del metabolisme energètic cel·lular i contribueix significativament en l'estudi de la patofisiologia d'una gran varietat de patologies com diferents encefalomiopaties, malalties neurodegeneratives i càncer (Lin *et al.*, 2006; Schapira *et al.*, 2007).

Un dels mètodes més àmpliament utilitzats per estimar la funció i disfunció dels mitocondris és la mesura de les activitats enzimàtiques dels complexos de la cadena respiratòria. No obstant, aquests assajos no són suficients per un anàlisi complet dels possibles defectes mitocondrials, ja que no donen informació sobre la interacció física ni funcional entre els diferents complexos. Un altre mètode desenvolupat més recentment és la mesura del consum d'oxigen *in situ* en fibres musculars permeabilitzades. Aquesta tècnica permet caracteritzar funcionalment els mitocondris en una situació més fisiològica, ja que es mantenen les interaccions essencials amb altres òrgans.

Atès que cadascuna de les metodologies esmentades presenta una sèrie d'avantatges i inconvenients i que ambdues proporcionen informació complementària, durant aquesta tesi doctoral s'han utilitzat les dues aproximacions per tal d'analitzar el paper de Mfn2 en la funció mitocondrial del múscul esquelètic. Altres estudis metabòlics que s'han portat a terme durant la realització d'aquesta tesi han estat la mesura de l'oxidació de glucosa i la incorporació de glucosa en glicogen en múscul esquelètic.

En el cas de la sobreexpressió de la forma hMfn2 Δ 614-757 i de la repressió de Mfn2 mitjançant els miRNAs, aquests assajos metabòlics han estat efectuats al cap de 15 dies de l'electrotransferència, quan els animals tenien unes 12 setmanes aproximadament. En el cas del model de ratolí *knockout* de Mfn2, els experiments de respirometria i d'oxidació de glucosa s'han realitzat en animals de 20 setmanes d'edat.

E.1) ASSAJOS ENZIMÀTICS

Les activitats enzimàtiques dels complexos de la cadena respiratòria es poden mesurar a partir de múscul congelat, i a més, es necessita una quantitat relativament petita de teixit per poder efectuar aquests assajos. Això representa un avantatge important ja que no sempre és possible disposar d'una bona quantitat de mostra fresca. Com hem mencionat anteriorment, però, aquest mètode només permet detectar defectes a nivell dels complexos individuals; per tant es pot donar el cas que havent-hi defectes en la capacitat oxidativa dels mitocondris no es detectin anomalies en les activitats enzimàtiques dels complexos OXPHOS.

En aquesta tesi doctoral s'han determinat les activitats dels complexos de la cadena respiratòria en el múscul tibialis anterior provinent dels dos models murins generats per electrotransferència d'ADN (apartat C.1). Totes les activitats enzimàtiques s'han mesurat espectrofotomètricament en cubetes de plàstic de 1,5ml i 1cm de longitud de pas mitjançant l'espectrofotòmetre *Evolution 600* (Thermo), acoblat al *Water Peltier System PCB 150* (Thermo), que permet mantenir constant la temperatura òptima durant la mesura de les activitats enzimàtiques. Els reactius necessaris per la determinació de les activitats han estat adquirits a Sigma.

E.1.1) Obtenció d'homogenats del múscul tibialis anterior per la mesura d'activitats enzimàtiques

1- Es descongelen els músculs en una placa amb tampó I (KCl 0,1M, MgCl₂ 5mM, EGTA 5mM i pirofosfat sòdic 5mM; pH 6,8) en presència dels següents inhibidors de proteases: aprotinina 0,14 U/ml, PMSF 1mM, leupeptina 2µM i pepstatina A 2µM. Durant tot el procés els músculs es mantenen en gel.

2- Es trossegen amb material de cirurgia i s'incuben en tampó I durant 10 minuts. Es fa un canvi de tampó I i s'incuben 10 minuts més.

3- Es canvia el tampó I per tampó II (sacarosa 250mM, KCl 50mM, EDTA 5mM, MgCl₂ 5mM i pirofosfat sòdic 1mM; pH 7,4) utilitzant els mateixos inhibidors de proteases. S'incuben els trossets de múscul en aquest nou tampó durant 10 minuts.

4- Es posen els trossets de múscul en un tub amb tampó II (la relació volum de tampó (ml) / pes teixit (g) és de 10:1) i es disgreguen mitjançant acció mecànica utilitzant un

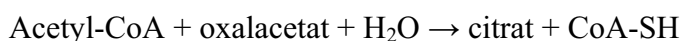
politró, 5 polsos de 5 segons a màximes rpm. Hem utilitzat tot el tibialis anterior (entre 40-50 mg) per a l'obtenció de l'homogenat.

5- Aquest primer extracte s'homogeneïtza unes 15 vegades en un homogeneïtzador de vidre, en contacte amb gel, amb un èmbol de tefló a unes 1800rpm.

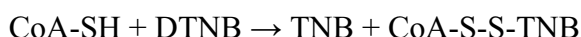
6- Es recull l'homogenat en un tub eppendorf i es centrifuga durant 10 minuts a 800xg a 4°C. Amb aquesta centrifugació a baixes revolucions precipiten les fibres no disgregades i els nuclis, que podrien interferir en la mesura de les activitats. Es recupera el sobrenedant, es valora la concentració de proteïnes (apartat F.2) i es fan alíquotes amb la quantitat necessària de mostra per mesurar cada activitat. Les alíquotes es congelen a -80°C i només es descongelen un cop.

E.1.2) Activitat citrat sintasa (CS)

La citrat sintasa és un enzim del cicle de Krebs que s'utilitza habitualment com a marcador de la quantitat de mitocondris funcionals d'una mostra (Holloszy *et al.*, 1970; Hood *et al.*, 1989), ja que l'activitat CS expressada per quantitat de proteïna mitocondrial es manté bastant constant dins d'un determinat teixit. La CS catalitza la següent reacció:



En l'assaig enzimàtic aquesta reacció s'acobla a la reacció química irreversible:



L'activitat citrat sintasa es determina seguint l'increment d'absorbància a $\lambda = 412$ nm, produït per la formació de TNB a 25°C.

Procediment:

1- S'afegeix a la cubeta la barreja de reacció formada per DTNB, AcetilCoA, Tritó X-100, H₂O i entre 5-10 µg de proteïna de l'homogenat de múscul (Taula 3).

2- S'agita la cubeta i es mesura l'absorbància durant 3 minuts (Lectura 1).

3- S'afegeix oxalacetat (Taula 3) i es registra la variació d'absorbància durant 2 minuts (Lectura 2).

4- Càlcul de l'activitat específica de la citrat sintasa (Unitats: nmol/(min·mg prot.)

$$\frac{(\text{Lectura 2} - \text{Lectura 1}) \cdot 1000 \cdot \text{Vol total (ml)}}{\varepsilon_{\text{TNB}} (13,6 \text{ ml/nmol} \cdot \text{cm}) \cdot \text{Vol. mostra (ml)} \cdot [\text{prot}] \text{ mg/ml} \cdot 1 \text{ cm}}$$

Compost	Concentració stock	Vol. (µl)	Concentració final
Mostra		2-5 ¹	
DTNB ²	1 mM	100	100 µM
Acetil CoA	10 mM	30	300 µM
Tritó X-100	10% (v/v)	10	0,1%
Oxalacetat ³	10 mM	50	500 µM
H ₂ O		810 ⁴	

Taula 3. Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat citrat sintasa. ¹ Per a la determinació d'aquesta activitat s'utilitzen entre 5-10 µg de proteïna que equivaldrien a 2-5 µl d'homogenat. ²El DTNB es prepara en Tris-HCl 1M; pH 8. ³L'oxalacetat es prepara en Tris-HCl 0,1M; pH 8. ⁴El volum exacte d'H₂O per arribar al volum final de reacció (1ml) dependrà dels µl d'homogenat utilitzats. Les concentracions stock d'acetil CoA i oxalacetat es poden preparar amb anterioritat i conservar a -20°C; el DTNB es prepara fresc cada vegada i el detergent es pot deixar preparat a 4°C.

E.1.3) Activitat del complex I (NADH: Q₁₀ oxidoreductasa)

L'activitat del complex I es determina mitjançant la mesura de l'oxidació sensible a la rotenona del NADH, utilitzant Q₁ (anàleg de Q₁₀) com a acceptor final d'electrons (Birch-Machin *et al.*, 1994).

La mesura de l'activitat del complex I es realitza a 30°C, seguint la disminució d'absorbància a $\lambda = 340 \text{ nm}$, deguda a la desaparició del NADH. L'oxidació del NADH es mesura afegint i sense afegir rotenona. La diferència entre les dues mesures representa l'activitat específica del complex I.

Procediment:

1- S'afegeix a la cubeta la barreja de reacció formada pel tampó fosfat potàssic (KP); pH 8, NADH, azida sòdica (NaN₃), BSA, H₂O i entre 50-80 µg de proteïna de l'homogenat de múscul (Taula 4).

2- Es preincuba aquesta mescla a 30°C durant 10 minuts i es registra la línia base durant 2 minuts (Lectura 1).

3- S'afegeix CoQ₁ (Taula 4), s'incuba 30 segons i es registra l'absorbància durant 2 minuts (Lectura 2).

4- S'afegeix rotenona (Taula 4), s'incuba 30 segons i es registra l'absorbància durant 2 minuts (Lectura 3).

5- Càlcul de l'activitat específica del complex I (Unitats: nmol/(min·mg prot.)

$$\frac{(\text{Lectura 2-Lectura 3}) \cdot 1000 \cdot \text{Vol total (ml)}}{\epsilon_{\text{NADH}} (6,22 \text{ ml/nmol} \cdot \text{cm}) \cdot \text{Vol. mostra (ml)} \cdot [\text{prot}] \text{ mg/ml} \cdot 1 \text{ cm}}$$

Compost	Concentració <i>stock</i>	Vol. (µl)	Concentració final
Mostra		25-40 ¹	
Tampó KP pH 8	40 mM	500	20 mM
NADH	2 mM	100	0,2 mM
NaN ₃	50 mM	20	1 mM
BSA ²	10 mg/ml	100	1 mg/ml
CoQ ₁	1 mM	50	50 µM
Rotenona ³	0,25 mM	20	5 µM
H ₂ O		200 ⁴	

Taula 4. Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat NADH: Q₁₀ oxidoreductasa. ¹ Per a la determinació d'aquesta activitat s'utilitzen entre 50-80 µg de proteïna que equivaldrien a 25-40 µl d'homogenat. ² La BSA es prepara en EDTA 10mM, pH 7,4. ³ La rotenona es prepara en etanol 100%. ⁴ El volum exacte d'H₂O per arribar al volum final de reacció (1ml) dependrà dels µl d'homogenat utilitzats. Les concentracions *stock* dels diferents reactius es poden preparar amb anterioritat i conservar a -20°C (la rotenona protegida de la llum) i el tampó i la solució de BSA es conserven a 4°C.

E.1.4) Activitat del complex II (Succinat deshidrogenasa)

L'activitat del complex II es pot mesurar seguint l'oxidació del succinat, utilitzant DCPIP com a acceptor final d'electrons. Els electrons alliberats durant la conversió de succinat a fumarat es transfereixen al CoQ₁₀, que és reoxidat pel DCPIP (Fischer *et al.*, 1985). La reducció del DCPIP es registra mesurant la variació d'absorbància a $\lambda = 600$ nm a 30°C.

Procediment:

1- S'afegeix a la cubeta la barreja de reacció formada per tampó fosfat potàssic (KP); pH 7, KCN, DCPIP, H₂O i entre 50-100 µg de proteïna de l'homogenat de múscul (Taula 5).

2- Es preincuba aquesta mescla a 30°C durant 2 minuts.

3- S'afegeix succinat (Taula 5) i es registra la variació d'absorbància durant 2 minuts.

4- Càlcul de l'activitat específica del complex II (Unitats: nmol/(min·mg prot.)

$$\frac{(\text{Lectura}) \cdot 1000 \cdot \text{Vol total (ml)}}{\epsilon_{\text{DCPIP}} (19 \text{ ml/nmol} \cdot \text{cm}) \cdot \text{Vol. mostra (ml)} \cdot [\text{prot}] \text{ mg/ml} \cdot 1 \text{ cm}}$$

Compost	Concentració <i>stock</i>	Vol. (µl)	Concentració final
Mostra		25-50 ¹	
Tampó KP pH 7	0,1 M	500	50 mM
KCN ²	30 mM	50	1,5 mM
DCPIP	1 mM	100	0,1mM
Succinat	320 mM	50	16 µM
H ₂ O		250 ³	

Taula 5. Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat Succinat deshidrogenasa. ¹ Per a la determinació d'aquesta activitat s'utilitzen entre 50-100 µg de proteïna que equivaldrien a 25-50 µl d'homogenat. ² El KCN es guarda alíquotat a -20°C a una concentració *stock* de 100mM. El dia de l'experiment es dilueix fins a 30 mM en aigua miliQ. ³ El volum exacte d'H₂O per arribar al volum final de reacció (1ml) dependrà dels µl d'homogenat utilitzats. Les concentracions *stock* dels diferents reactius es poden preparar amb anterioritat i conservar a -20°C (el DCPIP protegit de la llum) i el tampó es conserva a 4°C.

E.1.5) Activitat del complex III (Decilubiquinona:citocrom c oxidoreductasa)

L'activitat del complex III es determina utilitzant com a substrat decilubiquinol en estat reduït (DBH₂), en presència de citocrom c oxidat i de NaN₃. Es produeix l'oxidació del DBH₂ pel complex III, seguida de la reducció del citocrom c. El NaN₃ s'afegeix per inhibir la citocrom c oxidasa (complex IV) i evitar l'oxidació del citocrom c reduït per aquest enzim (Birch-Machin *et al.*, 1994). L'activitat del complex III es mesura com a l'increment d'absorbància a $\lambda = 550 \text{ nm}$, degut a la reducció del citocrom c, a 25°C. Com a control negatiu s'addiciona antimicina A, un inhibidor específic del complex III, en una de les cubetes. D'aquesta manera podrem avaluar el *background* de la reacció i restar-lo de l'activitat obtinguda sense antimicina A.

Procediment:

1- El decilubiquinol es redueix just abans de realitzar l'assaig enzimàtic. Per fer-ho, es prepara una solució de decilubiquinol 50 mM en DMSO i es fan alíquotes de 100 µl. A una d'aquestes alíquotes s'hi afegeix una punta d'espàtula de KBH₄ i 30 µl de HCl 1M afegits de 10 µl en 10 µl. S'agita la mescla i es mesura el pH amb tires indicadores

fins que s'arriba a pH 4 i la solució es fa transparent i incolora. Les alíquotes de decilubiquinol 50 mM no reduït es poden guardar a -20°C.

2- S'afegeix a la cubeta la barreja de reacció formada per tampó fosfat potàssic (KP); pH 7,8, NaN₃, EDTA, Tween 20, citocrom c, DBH₂ i H₂O. La barreja de reacció del control negatiu serà idèntica a la descrita però afegint-hi antimicina A (Taula 6).

3- Es registra ràpidament la línia base durant 5 minuts (Lectura 1).

4- S'afegeixen aproximadament 5 µg de proteïna de l'homogenat de múscul.

5- Es registra la variació d'absorbància durant 5 minuts (Lectura 2).

6- Càlcul de l'activitat específica del complex III (Unitats: nmol/(min·mg prot.).

$$\frac{(\text{Lectura 2 (-Ant.A)} - \text{Lectura 2 (+Ant.A)}) \cdot 1000 \cdot \text{Vol total (ml)}}{\epsilon_{\text{cit c}} (21,1 \text{ ml/nmol}\cdot\text{cm}) \cdot \text{Vol mostra (ml)} \cdot [\text{prot}] \text{ mg/ml} \cdot 1 \text{ cm}}$$

Compost	Concentració <i>stock</i>	Vol. (µl)	Concentració final
Mostra		2-3 ¹	
Tampó KP pH 7,8	50 mM	250	25 mM
NaN ₃	300 mM	5	3 mM
EDTA	100 mM	5	1 mM
Tween 20	2 % (v/v)	10	0,04 %
Citocrom c	1 mM	50	100 µM
DBH ₂	50 mM	5	500 µM
Antimicina A ²	2 mM	3	12 µM
H ₂ O		175 ³	

Taula 6. Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat Decilubiquinona:citocrom c oxidoreductasa. ¹ Per a la determinació d'aquesta activitat s'utilitzen 5 µg de proteïna que equivaldrien a 2-3 µl d'homogenat. ² L'antimicina A es prepara en etanol absolut i només es posa a la cubeta del control negatiu. ³ El volum exacte d'H₂O per arribar al volum final de reacció (500 µl) dependrà dels µl d'homogenat utilitzats. Les concentracions *stock* dels diferents reactius es poden preparar amb anterioritat i conservar a -20°C i el tampó i el detergent es conserven a 4°C.

E.1.6) Activitat del complex IV (Citocrom c oxidasa)

L'activitat citocrom c oxidasa (COX) es determina segons el mètode descrit per Rustin i col·laboradors (Rustin *et al.*, 1994). L'activitat del complex IV es mesura seguint l'oxidació del citocrom c, prèviament reduït, com la disminució d'absorbància a λ = 550 nm a 25°C.

Procediment:

1- El citocrom c es redueix just abans de realitzar l'assaig enzimàtic. Per fer-ho, es prepara una solució de citocrom c al 1% (p/v) i se li afegeix uns granets de ditionita sòdica. En reduir-se, el citocrom c adopta un to més ataronjat. Per eliminar l'excés de ditionita es centrifuga a 6.500xg a 4°C durant 5 minuts i es recupera el sobrenedant.

2- S'afegeix a la cubeta la barreja de reacció formada per tampó fosfat potàssic (KP); pH 7, citocrom c reduït, lauril maltòsid i entre 2,5-5 µg de proteïna de l'homogenat de múscul (Taula 7).

3- S'agita suaument per inversió i es llegeix l'absorbància durant 10 minuts. En iniciar-se la lectura l'absorbància ha d'estar entre 1,2 i 1,3; si no, s'ha d'ajustar el volum de citocrom c reduït. Es calcula el pendent entre els minuts 5 i 10 sempre i quan existeixi linealitat.

4- Càlcul de l'activitat específica del complex IV (Unitats: nmol/(min·mg prot.)

$$\frac{\Delta \text{Abs}_{(550\text{nm})} \cdot 1000 \cdot \text{Vol total (ml)}}{\varepsilon_{\text{cit c}} (21,1 \text{ ml/nmol}\cdot\text{cm}) \cdot \text{Vol. mostra (ml)} \cdot [\text{prot}] \text{ mg/ml} \cdot 1 \text{ cm}}$$

Compost	Concentració stock	Vol. (µl)	Concentració final
Mostra		2 ¹	
Tampó KP pH 7	10 mM	925	10 mM
Citocrom c reduït	1 % (p/v)	70	0,07 %
Lauril maltòsid	125 mM	5	0,625 mM

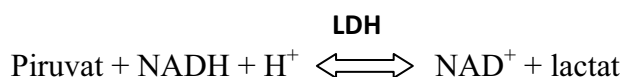
Taula 7. Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat citocrom c oxidasa. ¹ Per a la determinació d'aquesta activitat s'utilitzen de 2,5-5 µg de proteïna que equivaldrien a uns 2 µl d'homogenat de múscul. El lauril maltòsid es guarda aliquotat a -20°C i el tampó es conserva a 4°C.

E.1.7) Activitat del complex V (ATP sintasa)

L'activitat del complex V es mesura en la direcció inversa de la seva funció fisiològica, és a dir, com la hidròlisi de l'ATP en ADP + Pi. L'ADP produït es reconverteix en ATP segons la reacció següent:



El piruvat es redueix a lactat en l'últim pas de la reacció:



L'activitat del complex V es mesura seguint la disminució d'absorbància a $\lambda = 340\text{nm}$, deguda a l'oxidació del NADH, a 30°C . A la mateixa cubeta de reacció s'afegeix oligomicina (inhibidor específic del complex V) i es corregeix per l'activitat residual, deguda a altres ATP sintases cel·lulars.

Procediment:

1- S'afegeix a la cubeta la barreja de reacció formada per tampó H-Mg; pH 8, NADH, PEP, PK, LDH, antimicina A, H_2O i entre 5-10 μg de proteïna de l'homogenat de múscul (Taula 8).

2- Es registra la línia base durant 2 minuts (Lectura 1).

3- S'afegeix ATP (Taula 8), s'incuba 30 segons i es registra la variació d'absorbància durant 2 minuts (Lectura 2).

4- S'afegeix oligomicina (Taula 8), s'incuba 30 segons i es registra la variació d'absorbància durant 2 minuts (Lectura 3).

5- Càlcul de l'activitat específica del complex V (Unitats: $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg prot.})$)

$$\frac{(\text{Lectura 2}-\text{Lectura 3})\cdot 1000\cdot \text{Vol total (ml)}}{\epsilon_{\text{NADH}} (6,22 \text{ ml/nmol}\cdot\text{cm})\cdot \text{Vol. mostra (ml)}\cdot [\text{prot}] \text{ mg/ml}\cdot 1 \text{ cm}}$$

Compost	Concentració <i>stock</i>	Vol. (μl)	Concentració final
Mostra		2-5 ¹	
Tampó H-Mg (pH 8) ²		500	
NADH	30 mM	10	0,3 mM
PEP	50 mM	50	2,5 mM
PK	10 mg/ml	5	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
LDH	5 mg/ml	10	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Antimicina A ³	0,2 mg/ml	10	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
ATP (pH 7) ⁴	25 mM	100	2,5 mM
Oligomicina ³	0,2 mg/ml	10	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
H_2O		310 ⁵	

Taula 8. Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat ATP sintasa. ¹ Per a la determinació d'aquesta activitat s'utilitzen entre 5-10 μg de proteïna que equivaldrien a 2-5 μl d'homogenat. ² El tampó H-Mg conté MgSO_4 10 mM en HEPES-KOH 100mM, pH 8. ³ Les concentracions *stock* d'antimicina A i d'oligomicina es preparen en etanol al 50%. ⁴ L'ATP s'ajusta a pH 7 afegint un 3% de KHCO_3 3M ⁵ El volum exacte d' H_2O per arribar al volum final de reacció (1ml) dependrà dels μl d'homogenat utilitzats. Les concentracions *stock* dels diferents reactius es poden preparar amb anterioritat i conservar a -20°C ; les solucions *stock* dels enzims PK i LDH es preparen noves cada vegada i el tampó es conserva a 4°C .

E.1.8) Activitat dels complexos I + CoQ₁₀ + III (NADH: citocrom c oxidoreductasa sensible a la rotenona)

L'activitat dels complexos I+CoQ₁₀+III s'ha determinat d'acord al mètode descrit per Schapira i col·laboradors (Schapira *et al.*, 1990). Aquesta activitat es mesura seguint l'increment d'absorbància a $\lambda = 550$ nm, degut a la reducció del citocrom c, a 37°C.

Procediment:

1- Es preincuben 20 μ g de proteïna de l'homogenat de múscul amb uns 750 μ l d'H₂O a 37°C durant 1 minut amb l'objectiu de trencar les membranes mitocondrials.

2- S'afegeix a la cubeta la barreja de reacció formada per Tris; pH 8, KCN i citocrom c (Taula 9).

3- S'agita la cubeta per inversió i es registra la línia base durant 1 minut (Lectura 1).

4- S'afegeix NADH (Taula 9), s'agita la cubeta per inversió i es registra la variació d'absorbància durant 3 minuts (Lectura 2).

5- S'afegeix rotenona (Taula 9), s'agita i es llegeix durant 3 minuts (Lectura 3).

6- Càlcul de l'activitat específica dels complexos I+CoQ₁₀+III (Unitats: nmol/(min·mg prot.)

$$\frac{(\text{Lectura 2-Lectura 3}) \cdot 1000 \cdot \text{Vol total (ml)}}{\varepsilon_{\text{cit c}} (21,1 \text{ ml/nmol} \cdot \text{cm}) \cdot \text{Vol. mostra (ml)} \cdot [\text{prot}] \text{ mg/ml} \cdot 1 \text{ cm}}$$

Compost	Concentració <i>stock</i>	Vol. (μ l)	Concentració final
Mostra		10 ¹	
Tampó Tris ² (pH 8)	50 mM	200	10 mM
KCN	80 mM	3	0,24 mM
Citocrom c	2 mM	20	40 μ M
NADH	40 mM	10	0,4 mM
Rotenona ³	2 mM	2	4 μ M
H ₂ O (a 37°C)		750 ⁴	

Taula 9. Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat NADH: citocrom c oxidoreductasa sensible a la rotenona. ¹ Per a la determinació d'aquesta activitat s'utilitzen aproximadament 20 μ g de proteïna que equivaldrien a 10 μ l d'homogenat. ² El tampó Tris utilitzat també conté 5 mg/ml de BSA. ³ La concentració *stock* de rotenona es prepara en etanol 100% ⁴ El volum exacte d'H₂O per arribar al volum final de reacció (1ml) dependrà dels μ l d'homogenat utilitzats. Les concentracions *stock* dels diferents reactius es poden preparar amb anterioritat i conservar a -20°C (la rotenona protegida de la llum) i el tampó es conserva a 4°C.

E.1.9) Activitat dels complexos II + CoQ₁₀ + III (Succinat: citocrom c oxidoreductasa)

L'activitat succinat: citocrom c oxidoreductasa (complexes II+CoQ₁₀+III) ha estat determinada segons la metodologia descrita per Fischer i col·laboradors (Fischer *et al.*, 1985). Aquesta activitat es mesura monitoritzant l'augment d'absorbància a $\lambda = 550$ nm, degut a la reducció del citocrom c, a 25°C.

Procediment:

- 1- Es congela i es descongela 3 vegades una alíquota de l'homogenat de múscul.
- 2- S'afegeix a la cubeta la barreja de reacció formada per tampó fosfat; pH 7,4, succinat; pH 7,4, H₂O i uns 40 µg de proteïna de l'homogenat de múscul (Taula 10).
- 3- Es preincuba durant 30 minuts a 30°C.
- 4- S'afegeix NaN₃, rotenona i citocrom c (Taula 10).
- 5- S'agita lleugerament i es registra la variació d'absorbància durant 5 minuts.
- 6- Càlcul de l'activitat específica dels complexos II+CoQ₁₀+III (Unitats: nmol/(min·mg prot.)

$$\frac{\Delta \text{Abs}_{(550\text{nm})} \cdot 1000 \cdot \text{Vol total (ml)}}{\epsilon_{\text{cit c}} (21,1 \text{ ml/nmol}\cdot\text{cm}) \cdot \text{Vol. mostra (ml)} \cdot [\text{prot}] \text{ mg/ml} \cdot 1 \text{ cm}}$$

Compost	Concentració stock	Vol. (µl)	Concentració final
Mostra		20 ¹	
Tampó fosfat (pH 7,4)	62,5 mM	400	45 mM
Succinat (pH 7,4)	250 mM	40	17 mM
NaN ₃	100 mM	25	4 mM
Rotenona ²	2 mM	2	7 µM
Citocrom c	0,5 % (p/v)	75	0,065 %
H ₂ O		40 ³	

Taula 10. Barreja de reacció per a la determinació de l'activitat Succinat: citocrom c oxidoreductasa. ¹ Per a la determinació d'aquesta activitat s'utilitzen aproximadament 40 µg de proteïna que equivaldrien a 20 µl d'homogenat. ² La concentració *stock* de rotenona es prepara en etanol 100%. ³ El volum exacte d'H₂O per arribar al volum final de reacció (600 µl) dependrà dels µl d'homogenat utilitzats. Les concentracions *stock* dels diferents reactius es poden preparar amb anterioritat i conservar a -20°C (la rotenona protegida de la llum) i el tampó es conserva a 4°C.

E.2) RESPIROMETRIA EN FIBRES MUSCULARS PERMEABILITZADES

Un altre mètode per estudiar la funció mitocondrial és la mesura del consum d'oxigen en mitocondris aïllats a partir de diferents teixits. Els procediments estàndard de fraccionament cel·lular, basats en la centrifugació diferencial d'homogenats tissulars, permeten la caracterització *in vitro* de les propietats funcionals dels mitocondris (Frezza *et al.*, 2007). No obstant, aquest mètode presenta inconvenients importants, ja que es necessita una gran quantitat de teixit per obtenir una òptima qualitat de la preparació mitocondrial i a més, es perden les interaccions entre els mitocondris i els altres orgànuls cel·lulars. Això fa que les propietats funcionals dels mitocondris siguin completament diferents *in vivo* i *in vitro* (Saks *et al.*, 1998; Kunz *et al.*, 2000).

Per evitar aquestes limitacions recentment s'han desenvolupat diferents mètodes per mesurar el consum d'oxigen en fibres musculars permeabilitzades *in situ* (Kuznetsov *et al.*, 2008). La permeabilització de la membrana plasmàtica de les fibres musculars s'obté utilitzant agents químics com la digitonina o la saponina, que presenten una elevada afinitat pel colesterol de les membranes. Degut a la major presència de colesterol a la membrana plasmàtica (0,5 mol de colesterol per 1 mol de fosfolípids) que a les membranes intracel·lulars (relació molar 0,1 en el cas del reticle endoplasmàtic i 0,07 en el cas de la membrana mitocondrial externa), aquests agents permeabilitzen selectivament la membrana plasmàtica, deixant intactes les estructures membranoses intracel·lulars així com també els miofilaments i el citoesquelet (Kom *et al.*, 1969; Comte *et al.*, 1976). Com a conseqüència de la pèrdua d'integritat de la membrana, tots els metabòlits i enzims citosòlics són alliberats i la composició de l'espai intracel·lular s'equilibra ràpidament amb el medi d'incubació. Nombrosos estudis han confirmat que els mitocondris de les fibres musculars permeabilitzades responen a l'addició de diversos substrats i inhibidors, demostrant la seva integritat funcional (Kunz *et al.*, 1993; Saks *et al.*, 1998).

La mesura del consum d'oxigen *in situ* presenta avantatges importants respecte als mitocondris aïllats. En primer lloc, aquest mètode permet l'anàlisi dels mitocondris dins del context cel·lular, en la seva situació fisiològica i mantenint les interaccions essencials amb el citoesquelet, el nucli o el reticle endoplasmàtic (Kuznetsov *et al.*, 2008). A més, els mitocondris d'aquestes preparacions són més estables que en les

suspensions de mitocondris aïllats. Aquesta tècnica és útil tant per l'anàlisi *in situ* dels complexos de la cadena respiratòria (Kunz *et al.*, 2000) com per l'estudi de l'intercanvi de nucleòtids d'adenina entre els mitocondris i les ATPases cel·lulars (Khuchua *et al.*, 1994). Per últim, aquesta metodologia presenta l'avantatge que només requereix uns pocs mil·ligrams de teixit, de manera que es poden efectuar anàlisis en biòpsies humanes, fet que li proporciona una gran importància en clínica (Kuznetsov *et al.*, 1998).

Com tots els mètodes, la mesura del consum d'oxigen *in situ* també presenta certes limitacions que s'han de tenir en compte. Aquesta metodologia ens dona informació sobre la població mitocondrial total de les fibres, però no permet distingir entre les diferents subpoblacions mitocondrials (subsarcolemals, intermiofibrilars, perinuclears...). Un altre inconvenient és que no és possible estudiar l'impacte dels factors citosòlics sobre la respiració, ja que aquests components es perden durant el procés de permeabilització.

En aquesta tesi doctoral, aquesta metodologia s'ha utilitzat per analitzar el consum d'oxigen en el múscul tibialis anterior de ratolins que sobreexpressen la forma hMfn2 Δ 614-757 i de ratolins *knockout* de Mfn2 (apartat C de Materials i Mètodes).

E.2.1) Equipament necessari, manteniment i calibració instrumental

Per realitzar els experiments de consum d'oxigen en fibres musculars permeabilitzades s'ha utilitzat l'OROBOROS Oxygraph-2k (Figura 80), una variant de l'elèctrode d'oxigen de Clark. Aquest aparell es caracteritza per la seva alta resolució en les mesures fins i tot en el cas d'una baixa activitat respiratòria o de nivells baixos d'oxigen. A més, té l'avantatge que permet mesurar el consum d'oxigen en diferents tipus de mostres, des de mitocondris aïllats a cèl·lules o petites quantitats de biòpsies de teixits. Així, l'Oxygraph-2k presenta múltiples aplicacions, tant clíniques - diagnòsi de malalties mitocondrials, miopaties i altres desordres neuromusculars (Pecina *et al.*, 2004; Winkler *et al.*, 2005; Boushel *et al.*, 2007; Skovbro *et al.*, 2011) - com en el camp de la recerca bàsica - estudis de la funció cel·lular, apoptosi, necrosi, estudi de l'estrès oxidatiu, envelliment... (Gnaiger *et al.*, 2000; Hütter *et al.*, 2006).

L'anàlisi de dades ha estat efectuada amb el programa informàtic DatLab 4. El funcionament d'aquest programa, així com el muntatge (que ha estat efectuat durant la

realització d'aquesta tesi) i manteniment de l'aparell i dels sensors polarogràfics d'oxigen es poden consultar a la pàgina web de la companyia, www.orooboros.at.

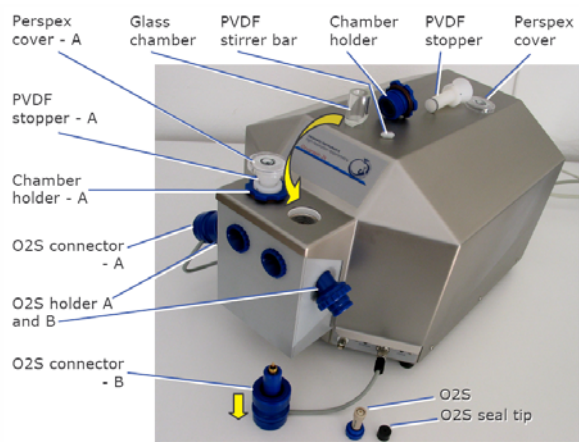


Figura 80. OROBOROS *Oxygraph-2k*. Fotografia de l'aparell amb tots els seus accessoris. Consta de dues cambres (A i B), de manera que permet realitzar les mesures per duplicat.

E.2.1.1) Calibració de l'*oxygraph-2k*

Abans de començar els experiments de respirometria és molt important calibrar bé l'aparell. Hi ha 2 tipus de calibracions, la calibració dels sensors polarogràfics d'oxigen o *air calibration* i la calibració instrumental o *background correction*. La primera s'ha de fer abans de cada experiment, mentre que la segona es pot fer 1 o 2 cops al mes, segons la freqüència d'utilització de l'equip. Les calibracions s'han d'efectuar sempre en les mateixes condicions en què es realitzarà l'experiment (medi, temperatura, sensibilitat o *gain setting*...).

Calibració dels sensors polarogràfics d'oxigen

Consisteix en l'estabilització del senyal d'oxigen en una situació de saturació d'aire (aproximadament una concentració de 200 nmols/ml d'O₂ al nivell del mar) que s'assoleix en agitar el medi d'incubació sense mostra a la cambra en contacte amb l'aire.

1- Després de netejar l'aparell, es posa medi en excés (2,2ml) a les cambres i s'hi inserten els *stoppers* (Figura 80) suaument, deixant una bombolla de gas per sobre la fase líquida. L'equilibri és un procés lent, l'estabilització del senyal s'assoleix aproximadament al cap d'una hora.

2- Quan el senyal és estable es fa la marca **R1** mitjançant el programa informàtic utilitzat (Figura 81). Per un *gain setting* de 2 el senyal registrat en saturació d'aire és de 4-5V. La calibració es considera correcta quan el consum d'oxigen en la situació de saturació d'aire està comprès entre -2 i 2 pmol/s·ml i el programa DatLab 4 t'indica un valor de pendent comprès entre -1 i 1.

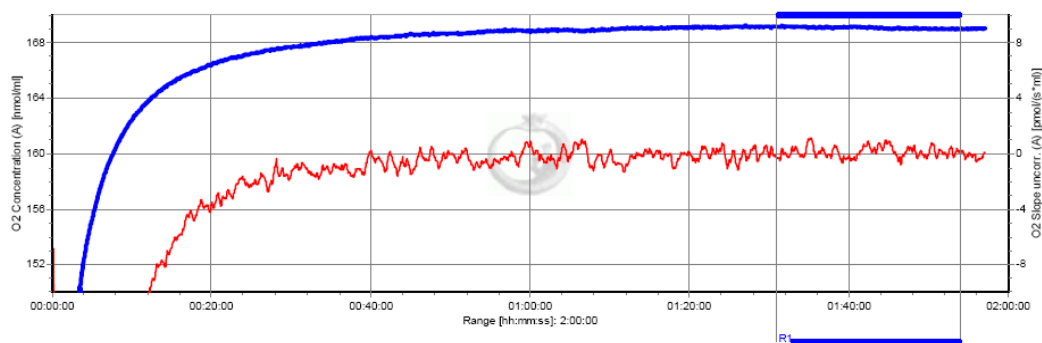


Figura 81. Exemple de calibració dels sensors polarogràfics d'oxigen. La línia blava indica la concentració d'O₂ de la cambra en nmol/ml. La línia vermella representa el consum d'oxigen expressat en pmol/s·ml. La marca R1 assenjala l'interval de temps en què el senyal d'oxigen es manté constant i el consum d'oxigen és proper a 0. La imatge representa les dades registrades durant 2 hores.

Calibració instrumental

El consum d'oxigen per part del sensor polarogràfic varia linearmenent en funció de la concentració d'oxigen, arribant a zero quan la pressió parcial d'oxigen és zero. La calibració instrumental permet determinar quin és aquest consum a diferents nivells d'oxigen i corregir o disminuir la variabilitat entre les dues cambres del mateix aparell o entre dos equips diferents.

Un cop feta la calibració dels sensors, es tanquen les cambres i es deixa establir el senyal del consum d'oxigen. Quan aquest és constant, s'obre lleugerament la cambra, es disminueix la pressió parcial d'oxigen afegint nitrogen o argó a la fase gasosa amb una xeringa, es tanca i es torna a deixar establir (Figura 82). Aquest procés es repeteix 4 o 5 vegades fins que s'obté una recta que relaciona la concentració d'oxigen en cada moment amb el consum d'oxigen. Els valors del pendent i de l'intercepte d'aquesta recta s'introdueixen al programa DatLab 4, que els utilitza per fer les correccions automàticament.

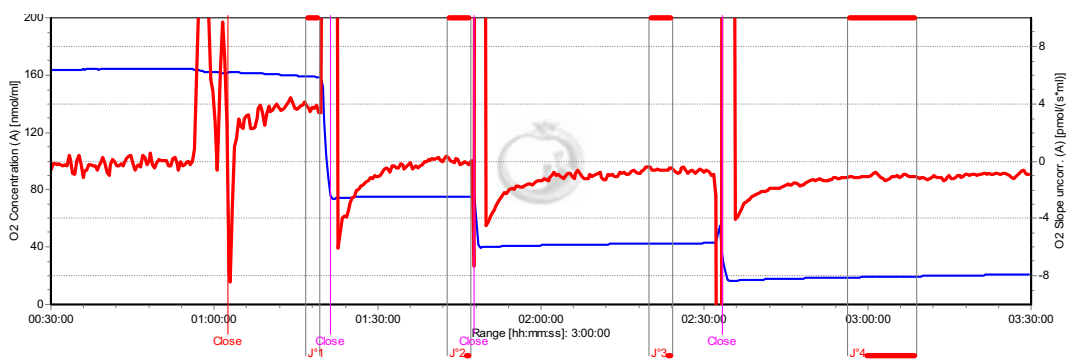


Figura 82. Exemple de calibració instrumental. La línia blava representa la concentració d'oxigen en nmol/ml i la línia vermella el consum d'oxigen en pmol/s·ml. Els intervals marcats (J1, J2, J3, J4) assenyalen l'oxigen consumit pel propi sensor en cada concentració d'oxigen determinada.

E.2.1.2) Neteja de les cambres de l'oxygraph-2k

La neteja de les cambres de l'oxygraph-2k és un aspecte molt important a tenir en compte tant abans com després de realitzar un experiment, ja que s'han d'eliminar possibles contaminants o restes dels diferents compostos utilitzats, entre ells els inhibidors, que podrien interferir en les mesures posteriors. El protocol de neteja de les cambres s'inicia fent 3 rentats amb H₂O miliQ, seguits de 3 rentats amb etanol absolut. Aleshores s'omplen les cambres amb etanol al 70% i es deixen així un mínim de 30 minuts. Abans de realitzar el següent experiment es fan 3 nous rentats amb H₂O miliQ i es tornen a equilibrar els sensors amb el medi MiR05.

E.2.2) Protocol de respirometria

En aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat un protocol que permet analitzar el funcionament global de la cadena respiratòria mitocondrial, mitjançant l'addició successiva de diferents substrats i inhibidors a les cambres de l'oxygraph-2k. Altres protocols que permeten un estudi més específic de cada complex, o protocols per treballar amb cèl·lules permeabilitzades o altres teixits es poden consultar a la web www.oroboros.at o a l'excel·lent revisió de Kuznetsov i col·laboradors (Kuznetsov *et al.*, 2008). Tots els substrats, inhibidors i reactius utilitzats per preparar els medis necessaris han estat adquirits a Sigma.

E.2.2.1) Preparació dels medis per a la permeabilització de les fibres musculars

Els medis utilitzats en els experiments de respirometria han estat el MiR05 (*Mitochondrial Respiration Medium*) i el BIOPS (*Biopsy Preservation Solution*) (Taula 11). Els medis d'incubació han de contenir compostos com sacarosa, mannitol, KCl, K-MES o K-lactobionat per mantenir l'osmolaritat similar a la fisiològica. També calen compostos addicionals per preservar la integritat dels mitocondris, com la taurina i el BSA, que s'utilitzen com a estabilitzadors de les membranes biològiques i com a ROS scavenger. Per últim, aquests medis també contenen Mg²⁺, ja que l'activitat de molts enzims depèn de la presència d'aquest catió, i EGTA com a quelant de Ca²⁺.

A		B	
Compost	Concentració final	Compost	Concentració final
EGTA	0,5 mM	CaK ₂ EGTA ³	2,77 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	3 mM	K ₂ EGTA ⁴	7,23 mM
K-lactobionat ¹	60 mM	Na ₂ ATP	5,77 mM
Taurina	20 mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	6,56 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM	Taurina	20 mM
HEPES	20 mM	Na ₂ Fosfocreatina	15 mM
Sacarosa	110 mM	Imidazol	20 mM
BSA ²	1 g/l	DTT	0,5 mM
		MES	50 mM

Taula 11. Composició dels medis MiR05 (A) i BIOPS (B). ¹Preparar una solució *stock* d'àcid lactobionic 0,5M i ajustar a pH 7 amb KOH. Aquesta solució es pot conservar a -20°C durant 6 mesos. ² S'utilitza BSA lliure d'àcids grassos. ³ Preparar una solució *stock* 100mM dissolent 2g de CaCO₃ en 200ml d'EGTA 100mM a 80°C. ⁴ Preparar una solució *stock* 100mM dissolent 7,61g d'EGTA i 2,3g de KOH en 200ml d'H₂O miliQ i ajustar a pH 7 amb KOH. Les solucions *stock* de CaK₂EGTA i K₂EGTA es preparen el mateix dia que el medi BIOPS.

Un cop preparats els medis MiR05 i BIOPS (1 litre de volum final), s'ajusta el pH a 7,1 amb KOH 5M. Es filtren i es divideixen en alíquotes de 20 ml que es guarden a -20°C fins a la seva utilització. Per a la preparació de les fibres musculars permeabilitzades també es necessita una solució *stock* de saponina 5 mg/ml, que es prepara el mateix dia de l'experiment.

E.2.2.2) Permeabilització de les fibres musculars

1- S'anestesia el ratolí amb una solució salina de ketamina i xilacina (100 i 10 mg/kg pes corporal, respectivament).

2- S'extreu el tibialis anterior i es posa en un tub amb 5 ml de medi BIOPS fred fins que s'hagin acabat d'extreure els músculs restants.

3- Es posa el múscul en una placa de Petri amb 1 ml de medi BIOPS fred (Figura 83a). Tota la manipulació del teixit es realitza en gel.

4- S'elimina curosament el teixit connectiu i amb l'ajuda de pinces i tisores es separa el múscul en diferents paquets de fibres, que es mantindran en medi BIOPS fred (Figura 83b). En aquest medi i a 4°C, la mostra es pot conservar durant hores, unes 6h. el múscul esquelètic de ratolí i fins a 24h. el múscul humà.

5- Sota una lupa binocular, utilitzant unes pinces amb punta arrodonida, es van disseccionant longitudinalment els paquets de fibres de manera que quedin *bundles* molt fins. El grau de separació es pot avaluar observant el canvi de color de les fibres, de

vermell a molt pà·lid. Aquest pas de permeabilització mecànica és crític ja que s'ha d'evitar danyar les fibres però a la vegada obtenir *strips* que continguin com a màxim entre 6-8 fibres individuals (Figura 83c).



Figura 83. Permeabilització mecànica de les fibres musculars.

6- Es transfereixen les fibres a una placa amb 2 ml de BIOPS fred amb 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de saponina (20 μl de la solució *stock*) i s'incuba durant 30 minuts a 4°C amb agitació suau.

7- Mentre es permeabilitzen les fibres, es posen 2 ml de MiR05 a les cambres de l'*oxygraph-2k* i s'equilibra el medi amb l'oxigen atmosfèric a la temperatura experimental requerida, en el nostre cas 37°C (apartat E.2.1.1).

8- Es transfereixen les fibres ja permeabilitzades a una placa amb 1 ml de medi MiR05 fred i s'incuben 10 minuts a 4°C amb agitació suau. Es repeteix aquest punt un altre cop. Aquests passos són importants per eliminar tant la saponina com altres metabòlits, sobretot ATP i ADP, que podrien interferir en les mesures.

E.2.2.3) Mesura del consum d'oxigen amb l'*oxygraph-2k*

1- Es pesen les fibres permeabilitzades amb una balança de precisió (*wet weight*). Per obtenir aquest valor, les fibres s'han d'agafar amb molta cura amb les pinces, donar uns tocs suaus sobre paper de filtre i immediatament posar-les en una placa de petri sobre la balança. En cada mesura s'utilitzen mostres de 2-4 mg.

2- En una altra placa en gel, es posen gotes de medi MiR05 separades entre si, on es posaran les mostres un cop anotat el pes.

3- De les gotes de MiR05 les fibres es transfereixen directament a les cambres de l'*oxygraph-2k*, que ja contenen 2 ml de medi MiR05 saturat d'aire i atemperat a 37°C.

4- Es col·loquen els *stoppers* a les cambres de manera que es vegi la bombolla d'aire i s'augmenta la concentració d'oxigen de l'interior fins a 500 μM amb una xeringa. Immediatament es tanquen completament les cambres i es deixa establir el senyal del consum d'oxigen durant 10-15 minuts. En el cas de les fibres s'ha d'augmentar tant

la concentració d'oxigen perquè la seva respiració es troba molt limitada per la difusió d'aquest. En el cas de cèl·lules permeabilitzades o mitocondris aïllats aquest punt no és necessari. Aquests experiments amb fibres musculars permeabilitzades es realitzen amb una sensibilitat o *Gain Setting* de 1, per no saturar el sensor.

A partir d'aquest moment comença el protocol de múltiples titulacions (Figura 84). S'ha de tenir en compte que després d'afegir cada reactiu s'ha d'esperar que el senyal de consum d'oxigen s'estabilitzi abans d'afegir el següent. També s'ha d'introduir al programa DatLab 4 el pes de les mostres de cada cambra, així com anar marcant cada nova addició que es realitza. Tots els reactius necessaris es poden preparar amb anterioritat i mantenir congelats a -20°C fins el dia de la seva utilització.

1- Amb una microxeringa Hamilton de $25\ \mu\text{l}$ s'afegeix a les cambres glutamat 10mM i malat $2\ \text{mM}$ per registrar el consum d'oxigen basal utilitzant substrats pel complex I. A aquesta respiració basal l'anomenem estat 4, *leak* o **GMN**.

2- S'afegeix ADP $2,5\ \text{mM}$ (concentració saturant). El consum d'oxigen estimulat per l'ADP és l'anomenat estat respiratori 3 o **GMD**.

3- S'addiciona citocrom c $10\ \mu\text{M}$, que serveix com a control de qualitat dels mitocondris, ja que permet comprovar la integritat de la membrana mitocondrial externa. Una estimulació de la respiració per part del citocrom c ens indicaria que la membrana mitocondrial externa està danyada. Aquest estat l'anomenem **GMDcit c**.

4- Seguidament s'afegeix succinat $10\ \text{mM}$. Amb aquesta addició s'obté la mesura de la capacitat respiratòria utilitzant substrats pels complexos I+II (**GMDS**).

5- Es va addicionant FCCP en diverses titulacions de $0,1\ \mu\text{M}$ cada una fins arribar al consum d'oxigen màxim. El FCCP s'afegeix per passos ja que una concentració massa alta pot tenir efectes inhibitoris. Aquest estat és una mesura de la capacitat màxima del sistema de transport electrònic, ja que el FCCP desacobla la cadena respiratòria de la síntesi d'ATP.

6- S'afegeix rotenona $0,5\ \mu\text{M}$, inhibidor específic del complex I. La taxa de respiració ha de disminuir ja que només se sosté pels substrats del complex II (**Srot**).

7- Per últim s'addiciona antimicina A $2,5\ \mu\text{M}$, inhibidor del complex III. La respiració residual es considera respiració no mitocondrial. Aquest estat s'anomena **rox** (*residual oxygen consumption*). Si volem expressar els resultats com a consum d'oxigen mitocondrial, es resta aquest valor rox dels valors anteriors.

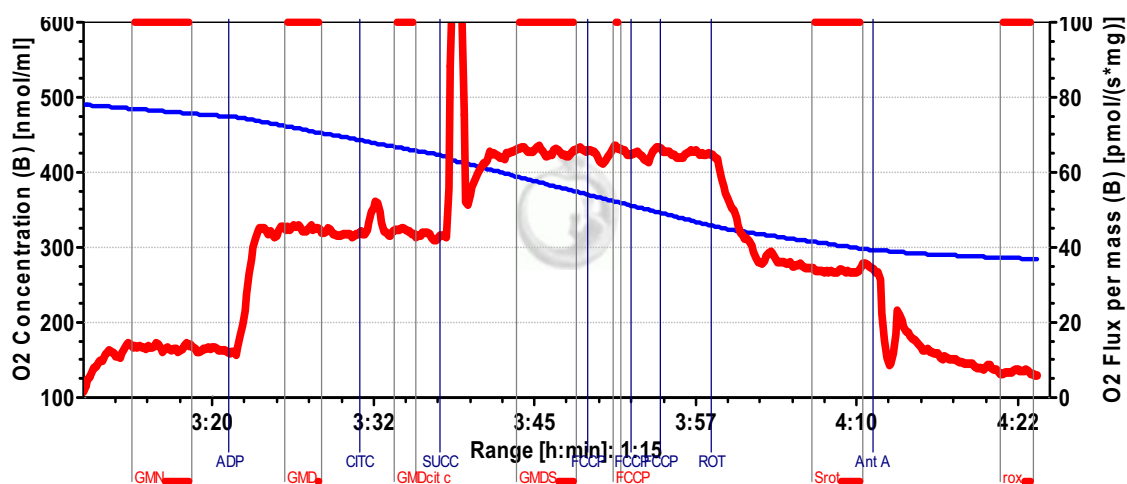


Figura 84. Protocol de respirometria en fibres musculars permeabilitzades. La línia blava és la concentració d'O₂ (nmol/ml) i la línia vermella és el consum d'oxigen per mg de múscul (pmol/s·mg). Les marques verticals en color blau indiquen el moment en què s'ha afegit cada substrat, mentre que els intervals marcats en vermell indiquen el valor del consum d'oxigen, en un període estable, en cada un dels diferents estats respiratoris. L'eix de les x representa el temps que dura l'experiment.

E.2.2.4) Càlculs i anàlisi de dades

Les dades obtingudes durant la realització dels diferents experiments s'han processat i analitzat amb el programa DatLab 4. Els resultats de consum d'oxigen es poden expressar en valors absoluts (pmol O₂ / s·mg teixit) o bé respecte a un valor de referència que sol ser la capacitat respiratòria màxima.

A partir d'aquestes dades també s'han calculat diferents *ratios* que ens donen informació sobre el grau d'acoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa o sobre el control que exerceixen els substrats pels diferents complexos sobre la respiració global. En aquesta tesi s'han calculat les següents *ratios*:

Respiratory Control Ratio (RCR_{GMD/GMN}): és el quocient entre el consum d'oxigen en estat 3 (amb ADP) i el consum d'oxigen en estat 4 (sense ADP). Ens indica l'estimulació de la respiració per part de l'ADP utilitzant substrats pel complex I, en aquest cas glutamat i malat (Gnaiger, 2009).

Succinate Control Ratio (SCR): és la *ratio* entre el consum d'oxigen amb substrats pels complexos I + II i la respiració amb substrats pel complex I (**GMDs/GMD**) (Gnaiger, 2009).

E.3) ANÀLISI DE L'OXIDACIÓ DE GLUCOSA

Els experiments d'oxidació de glucosa *ex vivo* han estat realitzats en tibialis anterior en el cas dels ratolins que expressen la forma hMfn2 Δ 614-757 i en soleus en el cas dels ratolins *knockout* de Mfn2. Generalment en aquests assajos s'utilitza el soleus, múscul oxidatiu compost principalment per fibres *slow-twitch*. En el cas de l'expressió de la forma truncada de Mfn2 però, davant la dificultat tècnica que presenta l'electrotransferència d'ADN en aquest múscul, s'ha optat per realitzar els experiments en tibialis, compost per una població mixta de fibres *slow-twitch* i *fast-twitch* però que permet una eficient electroporació i per tant una bona expressió de la proteïna d'interès. El protocol seguit en els dos casos ha estat el mateix, però amb la diferència que el tibialis anterior s'ha de seccionar per la meitat longitudinalment ja que el seu gran tamany dificultaria la difusió de l'oxigen i dels substrats al llarg de la fibra.

En aquests experiments s'utilitza glucosa marcada radioactivament, per tant és important treballar amb precaució i disposar de mitjans de tractament de residus radioactius. Per dur a terme aquest experiment es necessita material de cirurgia, vials de plàstic i de vidre, taps de goma estancs de 14,9 mm de diàmetre (Saint-Gobain Verneret), un bany amb agitació i sortida de carbogen.

Procediment:

1- Abans de l'experiment es prepara el medi KRBH (apartat B.3 de Materials i Mètodes), es gaseja amb carbogen (95% O₂ i 5% CO₂) uns 20 minuts i s'ajusta el pH a 7,4. Es suplementa el medi amb glucosa, 5 mM de concentració final, i es manté en fred.

2- S'anestesiïen els ratolins amb una injecció intraperitoneal d'una solució salina de ketamina i xilacina (100 i 10 mg/kg pes corporal, respectivament).

3- S'aïlla amb cura el múscul d'interès (soleus o tibialis anterior) i es col·loca en un vial de vidre amb 1 ml de KRBH amb 5 mM de glucosa. Es manté el teixit en gel fins a la seva utilització.

4- Es col·loquen els músculs en vials de plàstic amb 2 ml de KRBH amb 5 mM de glucosa i un 1% de BSA lliure d'àcids grassos (medi d'incubació). S'incuben durant 30 minuts en un bany a 37°C, en agitació suau i injectant contínuament carbogen a través del tap amb una agulla connectada a una sortida d'aquest gas.

5- Es preparen uns nous taps de goma posant-hi a l'interior un paper de filtre amb 200 μl de KOH 0,1M, que s'assegura amb una grapa (Figura 85).

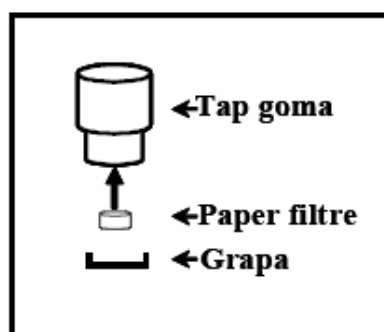


Figura 85. Esquema del muntatge dels taps de goma amb el paper de filtre saturat amb KOH 0,1M.

6- Es posen els músculs en vials de vidre amb 2 ml de medi d'incubació al que s'ha afegit D-[U]- ^{14}C glucosa (Amersham Biosciences) a una concentració d'1 $\mu\text{Ci} / \text{ml}$ i es tapen hermèticament amb els taps de goma. Hem de vigilar que el paper de filtre no toqui el medi radioactiu. S'incuben els músculs 1 hora a 37°C en agitació, injectant carbogen només durant els primers 15 minuts.

7- Al final de la incubació s'atura el consum de glucosa afegint al medi 300 μl d'àcid sulfúric 0,5 M, que a més, desplaça l'equilibri entre bicarbonat i CO_2 en el medi i allibera tot el CO_2 a la microatmosfera del vial.

8- S'incuben els vials durant 16 hores a temperatura ambient en agitació suau de manera que el CO_2 anirà quedant atrapat en el paper de filtre.

9- Es transfereix el paper de filtre en vials amb líquid de centelleig, s'agiten i es posen a comptar en el comptador beta Tri-Carb 2900TR (Packard) ubicat a la Instal·lació Radioactiva dels Serveis Científics del Parc Científic de Barcelona. Per conèixer les dpm totals del medi, en un vial amb líquid de centelleig s'hi posen 200 μl de medi d'incubació que també es posen a comptar en el comptador beta.

10- Es recupera el múscul, s'elimina l'excés de medi amb paper de filtre i es pesa.

Tenint en compte les dpms totals del medi d'incubació, la concentració de glucosa en els vials i les dpms en el paper de filtre, corresponent al CO_2 atrapat, podem calcular la quantitat de glucosa que ha estat oxidada. Els resultats s'expressen com a nmol de glucosa / h·mg de teixit.

E.4) ANÀLISI DE LA INCORPORACIÓ DE GLUCOSA A GLICOGEN

A partir de les mostres utilitzades en el protocol d'oxidació de glucosa (apartat E.3) també és possible determinar la quantitat de D-[U]-¹⁴Cglucosa que el múscul ha incorporat en forma de glicogen. Així, en finalitzar la incubació, es recull el múscul del vial, es treu l'excés de líquid amb paper de filtre i es congela ràpidament en nitrogen líquid fins a la seva utilització. El procediment seguit per tal de digerir el teixit i precipitar el glicogen ha estat el següent:

1- S'afegeixen 210 µl de KOH 1M a l'ependorf que conté el soleus i s'incuba durant 20 minuts a 70°C en agitació.

2- S'addicionen 40 µl d'una solució saturada de Na₂SO₄ i 50 µl d'una solució de glicogen 25 mg/ml no marcat. S'agita per inversió.

3- S'afegeixen 600 µl d'etanol absolut fred (-20°C), s'agita per inversió i s'incuba 1 hora a -20°C per precipitar el glicogen.

4- Es centrifuga durant 20 minuts a 3.000xg a 4°C i es descarta el sobrenedant.

5- S'afegeixen 250 µl d'aigua miliQ i es dissol el pellet de glicogen a 70°C en agitació.

6- S'addicionen 750 µl d'etanol fred (-20°C) i s'incuba 1 hora a -20°C per precipitar el glicogen.

7- Es centrifuga durant 20 minuts a 3.000xg a 4°C i es descarta el sobrenedant.

8- S'afegeixen 150 µl d'aigua miliQ i es dissol el pellet a 70°C.

9- Es transfereixen els 150 µl en vials amb líquid de centelleig, s'agiten i es posen a comptar en el comptador beta Tri-Carb 2900TR (Packard) ubicat a la Instal·lació Radioactiva dels Serveis Científics del PCB.

Tenint en compte les dpms totals del medi d'incubació, la concentració de glucosa en els vials i les dpms comptades, corresponents al glicogen precipitat, podem calcular la quantitat de glucosa que ha estat incorporada al glicogen. Els resultats s'expressen com a nmol de glucosa / h·mg de teixit.

F) TÈCNiques DE DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES

F.1) OBTENCIÓ D'EXTRACTES TOTALS I FRACCIONAMENT SUBCEL·LULAR PER A L'ANÀLISI PER *WESTERN BLOT*

En aquesta tesi s'ha treballat bàsicament amb proteïnes mitocondrials i per això en la major part dels experiments ha estat necessari obtenir fraccions enriquides en mitocondris. Existeixen molts protocols per a l'obtenció de fraccions subcel·lulars, la majoria dels quals es basen en la centrifugació diferencial d'un homogenat total. La composició del tampó d'homogeneïtzació dependrà de les característiques intrínseques de les cèl·lules o dels teixits i de la finalitat experimental dels mitocondris aïllats. S'ha de tenir en compte que amb aquests protocols s'obtenen fraccions enriquides en mitocondris, però que no són fraccions totalment pures.

F.1.1) Obtenció de fraccions enriquides en mitocondris a partir de cèl·lules

Normalment es parteix de 2 plaques de 10cm de diàmetre confluents per tal d'obtenir una quantitat suficient de proteïnes de cada fracció. En aquesta tesi doctoral s'han obtingut fraccions enriquides en mitocondris a partir de miotubs C2C12 a dia 5 de diferenciació. Tot el procediment es realitza en fred, col·locant les plaques sobre una superfície horitzontal en gel. El protocol següent és el següent:

1- S'aspira el medi de cultiu i es fan 2 rentats amb PBS. En aquest punt es pot continuar el protocol o bé es poden congelar les plaques a -80°C.

2- S'afegeixen 250 µl de tampó d'homogeneïtzació i es desenganxen les cèl·lules de la placa amb un *scraper*. El tampó, que conté sacarosa 0,25M, HEPES-NaOH 10mM i EGTA 1mM, es prepara el mateix dia de l'extracció, s'ajusta el pH a 7,4 i s'hi afegeix una pastilla d'inhibidors de proteases *Complete Mini* (Roche). Es manté en gel en tot moment.

3- Es recull la suspensió cel·lular obtinguda en un homogeneïtzador de vidre ubicat en gel i s'homogeneïtza unes 15 vegades a unes 1800 rpm amb un èmbol de tefló

connectat a un motor *Heidolph RZR 2051 control*. Aquest pas assegura una lisi cel·lular total.

4- Es recull l'homogenat en un tub eppendorf i se'n separen uns 100 µl que anomenarem "Homogenat total" (H). La resta de volum es centrifuga 10 minuts a 2000xg (4600rpm) a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5415R. Es separa el sobrenedant (SN1) en un nou eppendorf.

5- El precipitat obtingut, compost per mitocondris pesants i nuclis (M1), es ressuspend en 300 µl de tampó d'homogeneïtzació i es torna a centrifugar 10 minuts a 2000xg a 4°C. Es descarta el sobrenedant i es ressuspend el pellet amb 150 µl de tampó d'homogeneïtzació, aproximadament 5 cops el volum del precipitat. En el cas de cèl·lules musculars, en aquesta fracció M1 hi cau entre el 85-90% de la proteïna mitocondrial total; per aquest motiu en aquesta tesi s'ha treballat majoritàriament amb aquesta fracció.

Si es vol continuar amb el fraccionament subcel·lular, el protocol segueix així:

6- El SN1 es centrifuga 10 minuts a 13.000xg a 4°C i es separa el sobrenedant (SN2) en un altre tub.

7- El pellet o fracció M2 es ressuspend amb 50 µl de tampó. Aquesta fracció conté mitocondris més lleugers que no han precipitat en la primera centrífuga de 2.000xg.

8- El SN2 conté la fracció citosòlica i membranes totals (membrana plasmàtica, microsomes, endosomes...). Per separar el citosol de les membranes es fa una ultracentrifugació d'aquest SN2 a 100.000xg a 4°C durant 1 hora. El pellet correspon a les membranes i el sobrenedant al citosol.

9- Es realitza una valoració de la concentració de proteïnes de les diferents fraccions obtingudes (apartat F.2 de Materials i Mètodes). Aquestes fraccions s'aliquoten en diferents tubs (100 µg de proteïna per tub, aproximadament) per evitar contínues congelacions i descongelacions i es guarden a -80°C.

Les fraccions corresponents a l'homogenat total i les fraccions enriquides en mitocondris han estat les utilitzades en l'anàlisi dels nivells de proteïna per *Western Blot* (apartat F.3 de Materials i Mètodes).

F.1.2) Obtenció de fraccions mitocondrials de múscul esquelètic de ratolí

En el cas de l'extracció de mitocondris de múscul esquelètic, es requereix un tampó addicional amb una elevada concentració de sals per relaxar i solubilitzar les miofibril·les abans de la seva homogeneïtzació. Aquest pas és essencial per extreure de manera eficient els mitocondris d'aquest teixit i purificar-los per centrifugació diferencial. La composició d'aquest tampó de solubilització de fibres (Tampó I) és la següent: KCl 0,1M, MgCl₂ 5mM, EGTA 5mM i pirofosfat sòdic 5mM. S'ajusta el pH a 6,8 i s'hi afegeixen els següents inhibidors de proteases: aprotinina 0,14 U/ml, PMSF 1mM, leupeptina 2µM i pepstatina A 2µM.

La composició del tampó d'homogeneïtzació (Tampó II) emprat per extreure els mitocondris dels teixits és la següent: sacarosa 250mM, KCl 50mM, EDTA 5mM, MgCl₂ 5mM i pirofosfat sòdic 1mM. S'ajusta el pH a 7,4 i s'hi afegeixen els mateixos inhibidors de proteases que al Tampó I. Els dos tampons s'han de preparar el mateix dia de l'homogeneïtzació i es mantenen sempre en gel.

En aquesta tesi s'ha utilitzat aquest protocol bàsicament per obtenir mitocondris a partir de tibialis anterior, gastrocnemi i quàdriceps provinents dels diferents models murins generats. El procediment seguit, partint de músculs congelats a -80°C, ha estat el següent:

1- Es descongelen els músculs en una placa amb Tampó I, es trosseguen amb material de cirurgia i s'incuben durant 10 minuts. Es fa un canvi de Tampó I, s'incuben 10 minuts més, i finalment es posen en el Tampó II durant 10 minuts. Tot el procés es fa en fred.

2- Es posen els trossets de múscul en un tub amb Tampó II amb una relació volum de tampó (ml) / pes teixit (g) de 10:1 i es disgreguen mitjançant acció mecànica, fent 5 polsos de 5 segons a màximes rpm amb el polítró CPU.

3- Aquest primer extracte s'homogeneïtza 15 vegades a unes 1.800rpm en un homogeneïtzador de vidre, ubicat en gel, amb un èmbol de tefló connectat a un motor *Heidolph RZR 2051 control*.

4- Es recull l'homogenat (H) en un tub eppendorf i se'n separen uns 100µl que es mantindran en gel. La resta de volum es centrifuga 10 minuts a 1.300xg a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5415R i es separa el sobrenedant (SN1) en un nou eppendorf.

5- El precipitat es ressuspèn en Tampó II i es torna a repetir la centrifugació anterior. El precipitat conté una gran quantitat de miofibres i teixit no disgregat i és descartat.

6- El sobrenedant obtingut (SN2) s'ajunta amb el SN1 i es centrifuguen 15 minuts a 9.000xg a 4°C. El sobrenedant d'aquesta centrifugació (SN3) es guarda en un tub eppendorf en gel; aquesta fracció conté citosol i membranes lleugeres. El precipitat que sedimenta correspon a la fracció mitocondrial (M) de múscul esquelètic. Aquest pellet es ressuspèn amb un volum de Tampó II d'aproximadament 5 cops el tamany del precipitat.

7- El SN3 es pot sotmetre a una ultracentrifugació (100.000xg 1 hora a 4°C) per tal de separar el citosol de les membranes totals.

8- Es realitza una valoració de la concentració de proteïnes (apartat F.2 de Materials i Mètodes) de les diferents fraccions obtingudes, s'aliquoten en diferents tubs per evitar contínues congelacions i descongelacions i es guarden a -80°C.

Les fraccions corresponents a l'homogenat total i les fraccions enriquides en mitocondris han estat les utilitzades en l'anàlisi dels nivells de proteïna per *Western Blot* (apartat F.3 de Materials i Mètodes).

F.2) DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES

Existeixen diversos mètodes per determinar la concentració de proteïnes d'una mostra. En aquesta tesi s'ha utilitzat el mètode de l'àcid bicinonínic (BCA), mitjançant l'ús del kit *BCA Protein Assay Reagent* (Pierce). Aquest mètode es basa en la reducció de Cu^{2+} a Cu^{1+} que té lloc quan les proteïnes reaccionen amb el Cu^{2+} . Per tant, la quantitat de coure reduït és proporcional a la quantitat de proteïna de la mostra. Per altra banda, el Cu^{1+} produït reacciona amb l'àcid bicinonínic formant-se un compost de color porpra que té un màxim d'absorció a 562 nm. Aquest fet ens permet mesurar la quantitat de Cu^{1+} espectrofotomètricament i calcular la quantitat de proteïna present a la mostra. El protocol seguit és el recomanat per la casa comercial. Breument, en una placa d'ELISA de 96 pous es fa una recta patró, per duplicat, amb quantitats conegudes de BSA (concretament 0, 2, 5, 10 i 20 μg per pou). Es valoren les mostres per duplicat, afegint entre 2 i 10 μl de mostra per pou. Seguidament s'addicionen 200 μl del reactiu (196 μl de solució A + 4 μl de solució B) a cada pou i s'incuba la placa 30 minuts a 37°C. Es llegeix l'absorbància a 550 nm amb un lector de plaques *ELISA Sunrise Remote/Touch screen* (Tecan). Es calcula l'equació de la recta patró amb les dilucions

de BSA i a partir d'aquesta recta s'obté el valor de concentració de proteïnes d'una mostra en µg/ µl.

F.3) ANÀLISI DELS NIVELLS DE PROTEÏNA MITJANÇANT *WESTERN BLOT*

Aquesta tècnica consisteix en la detecció d'una determinada proteïna, mitjançant l'ús d'un anticòs específic, en una membrana en la que s'han immobilitzat el conjunt de proteïnes presents en una mostra. Consta de tres passos:

- 1) Electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants.
- 2) Transferència de les proteïnes a membranes de PVDF.
- 3) Immunodetecció de la proteïna d'interès.

F.3.1) Electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants

L'electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE: *Sodium dodecylsulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) és una de les tècniques més utilitzades habitualment per separar proteïnes en funció de la seva massa molecular (Laemmli, 1970). El detergent SDS, present tant a la mostra com en el gel, s'uneix a les proteïnes, les desnaturalitza i els confereix una càrrega negativa proporcional a la seva massa. Això fa que quan la mostra proteica es sotmet a un camp elèctric les proteïnes migrin cap al pol positiu en funció del seu tamany.

Per realitzar la SDS-PAGE s'utilitzen dos tipus de gels: el gel concentrador i el gel separador. El gel concentrador té un tamany de porus molt gran, ja que el seu percentatge d'acrilamida és només del 3,3%, i un pH de 6,8. Ambdues propietats faciliten que totes les proteïnes migrin a la mateixa velocitat i arribin al mateix temps al gel separador. Aquest fet augmenta la resolució de la separació segons el tamany de les proteïnes. En canvi, el percentatge d'acrilamida del gel separador varia en funció de la massa molecular de les proteïnes que ens interessa separar. Així, per proteïnes més grans de 80kDa el percentatge d'acrilamida òptim és del 7,5%, per proteïnes més petites de 30kDa seria del 15% i per proteïnes amb una massa molecular compresa entre 110 i 37 kDa utilitzaríem gels separadors amb un 10% d'acrilamida. Aquest darrer percentatge ha estat el més usat en aquesta tesi doctoral.

F.3.1.1) Preparació i polimerització dels gels

El sistema d'electroforesi emprat en aquesta tesi ha estat el Mini-Protean de BioRad. En tots els casos s'han preparat gels de 1,5 mm d'amplada. Es munten els vidres del sistema d'electroforesi segons les instruccions del fabricant. Primer es preparen 7,5 ml de la solució del gel separador. Cal tenir en compte que l'acrilamida no polimeritzada és neurotòxica i per tant, s'ha de manipular amb guants. La composició d'aquest gel és la següent: Acrilamida/Bisacrilamida (Pronadisa) al 7,5%, 10% o 15% d'acrilamida depenent del tamany de les proteïnes a separar, Tris-Base 0,375M; pH 8,8, SDS 0,1%, persulfat d'amoni 0,05 % i TEMED (BioRad) 2,2mM. Els dos darrers compostos s'afegeixen al final ja que són l'iniciador i el catalitzador de la polimerització, respectivament.

Aquesta solució s'afegeix entre els dos vidres del sistema. Immediatament després s'afegeix 1 ml d'aigua miliQ o 300 µl d'isopropanol per eliminar les bombolles degudes al SDS, per anivellar la superfície del gel i per afavorir la seva polimerització aïllant-lo de l'oxigen atmosfèric. Un cop polimeritzat, s'elimina l'aigua miliQ o l'isopropanol per decantació i es preparen 2,5 ml de la solució del gel concentrador. La seva composició és: Acrilamida/Bisacrilamida al 3,3 % d'acrilamida, Tris-HCl 0,125M; pH 6,8, SDS 0,1%, persulfat d'amoni 0,1% i TEMED 6,6 mM. S'afegeix a sobre del gel separador ja polimeritzat i immediatament es col·loca la pinta submergint-la en el gel i deixant que aquest polimeritzi a temperatura ambient.

F.3.1.2) Preparació de les mostres

Per afavorir la desnaturalització de les proteïnes afegim tampó de càrrega de Laemmli o LSB (*Loading Sample Buffer*) a les mostres i les escalfem 5 minuts a 95°C. A part de la desnaturalització de les proteïnes deguda a l'elevada temperatura, el tampó de Laemmli conté SDS, que també les desnaturalitza i els confereix la càrrega negativa necessària per dur a terme l'electroforesi.

La composició del tampó de càrrega (LSB 4X) és la següent: Tris-HCl 0,4M; pH 6,8; glicerol 69,6%; SDS al 8% (p/v) i Blau de bromofenol 0,05 mg/ml (que permet visualitzar la mostra en el gel). Aquesta solució és molt viscosa i s'ha de bullir per poder ésser pipetejada. S'emmagatzema a temperatura ambient. Cal diluir-lo 1/4 en la mostra.

A més, les proteïnes poden unir-se entre elles mitjançant ponts disulfur. Per tant, perquè les proteïnes migrin segons el seu pes molecular, és important trencar aquests ponts mitjançant la reducció dels mateixos amb DTT a una concentració final de 100 mM. El DTT s'afegeix juntament amb el LSB abans de bullir les mostres. Un cop bullides, es poden carregar directament al gel o bé guardar-les a -80°C.

F.3.1.3) Electroforesi

Es col·loquen els gels polimeritzats en el sistema d'electroforesi i s'omple la cubeta amb el tampó d'electroforesi. La composició d'aquest tampó és: Tris-Base 25 mM, glicina 0,19 M i SDS 0,1%. Es treuen les pintes i es carreguen tant les mostres de proteïna com un marcador de massa molecular pretenyit (*Prestained SDS-PAGE standards Broad Range*, BioRad) amb una xeringa Hamilton. Aquest marcador és molt important per calcular el pes molecular de la proteïna d'interès i per discriminar l'ordre de càrrega del gel. En els gels Mini Protean es poden carregar fins a 90µg de proteïna total, tot i que habitualment n'hem carregat entre 20 i 40µg.

Es col·loca la tapa amb els elèctrodes, es connecta a una font d'alimentació i es duu a terme l'electroforesi a un voltatge constant de 150 V a temperatura ambient fins que comença a sortir el front de blau de bromofenol del gel. Aquest temps és aproximadament 1h 30' en el cas dels gels al 10% d'acrilamida. Finalment, es desmunta el sistema i es recupera el gel separador.

F.3.2) Transferència de les proteïnes a membranes de PVDF

Aquest procés permet transferir les proteïnes del gel a una membrana de nitrocel·lulosa o de PVDF, on queden immobilitzades per adsorció. En aquesta tesi hem emprat membranes de PVDF ImmobilonTM (Millipore). La força que promou el pas de les proteïnes del gel a la membrana és l'aplicació d'un camp elèctric entre els dos. El procediment de la transferència és el següent:

1- Es prepara 1 litre de tampó de transferència que conté Tris-Base 25 mM, glicina 0,19 M pH 8,3 i metanol al 20%.

2- Es tallen 2 fragments de paper Whatmann 3MM per gel. El tamany ha de ser lleugerament inferior al de les esponges del casset de l'equip de transferència Mini Protean TransBlot Cell (BioRad). Es talla un tros de membrana de PVDF del mateix

tamany que el gel (aproximadament 8,5x6cm) i s'activa en metanol absolut durant 1 minut.

3- Es submergeix tot el material (cassets, esponges, membrana, papers Whatmann) en tampó de transferència per equilibrar-lo.

4- El muntatge dels cassets de transferència es realitza en una safata amb tampó de transferència. Sobre la part negra del casset es col·loca en aquest ordre: una esponja, el paper Whatmann i el gel. Seguidament es disposa la membrana activada i s'eliminen les bombolles que puguin quedar entre el gel i la membrana. Es posa l'altre paper Whatmann a sobre la membrana, una altra esponja i es tanca el casset. És molt important l'orientació del casset, ja que les proteïnes carregades negativament per l'SDS aniran del pol negatiu (banda negra del casset i de la cubeta) al pol positiu (banda transparent del casset i cara vermella de la cubeta).

5- Es col·loquen els cassets a la cubeta i un bloc de gel per evitar un escalfament excessiu. S'omple la cubeta amb tampó de transferència i es connecta a la font d'alimentació. La transferència es duu a terme a un amperatge constant de 250 mA durant 1 hora i 30 minuts. Una vegada acabada, es desmunta el sistema, es recupera la membrana procurant que no s'assequi i s'inicia la immunodetecció (apartat F.3.3).

6- Per comprovar l'eficiència de la transferència es pot tenyir el gel amb Coomassie Brilliant Blue. Alhora, aquest gel es pot emprar com a control de càrrega de proteïna total, ja que la transferència sempre és parcial i el coomassie és prou sensible per a la detecció de la proteïna retinguda en el gel. Alternativament, la membrana es pot tenyir amb el colorant reversible de proteïnes Ponceau.

F.3.3) Immunodetecció de la proteïna d'interès

Aquest procés permet detectar específicament la proteïna d'interès a la membrana de PVDF on ha estat prèviament transferida. Consisteix bàsicament en quatre fases:

1- Bloqueig de la membrana amb una solució rica en proteïnes per evitar la unió inespecífica de l'anticòs primari al PVDF. En aquesta tesi les membranes han estat bloquejades amb PBS amb un 5% (p/v) de llet descremada, durant 1 hora i a temperatura ambient en agitació. Alternativament es pot realitzar durant 16 hores a 4°C.

2- Incubació de la membrana amb l'anticòs primari específic per la proteïna d'interès. S'incuba la membrana amb 5 ml de la solució de l'anticòs primari durant 16

hores a 4°C, en agitació. Tots els anticossos primaris utilitzats en aquesta tesi han estat diluïts en la solució de bloqueig (Taula 12). Després de la incubació es renta la membrana per eliminar l'excés d'anticòs primari. S'han realitzat 3 rentats de 10 minuts amb PBS-Tween 20 al 0,1% (v/v) a temperatura ambient, independentment de l'anticòs utilitzat.

3- Incubació de la membrana amb un anticòs secundari conjugat afí a l'anticòs primari utilitzat. Tots els anticossos secundaris emprats en aquesta tesi estaven conjugats amb peroxidasa de rave HRP (*Horse Radish Peroxidase*) i han estat adquirits a la companyia Jackson. La solució d'anticòs secundari s'ha preparat en PBS amb un 1% (p/v) de llet descremada, fent una dilució 1/10000 en el cas del secundari que reconeix IgG de conill i de 1/25000 en el cas del que reconeix IgG de ratolí. La membrana s'incuba amb la solució d'anticòs secundari durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació. Transcorregut aquest temps es realitzen 3 rentats de 10 minuts amb PBS-Tween 20 al 0,1% (v/v), a temperatura ambient, per eliminar l'excés d'anticòs secundari.

4- Revelat. S'incuba la membrana durant 1 minut amb el reactiu ECL (*Enhanced ChemioLuminescence*; Amersham Biosciences). Tot seguit es col·loca en un casset d'exposició (Wolf) i, a la cambra fosca, es posa en contacte amb un film autoradiogràfic (Amersham Biosciences) a diferents temps d'exposició. Els films han estat revelats mitjançant un revelador automàtic *HyperProcessor Model AM4* (Amersham Pharmacia Biotech).

Un cop revelat el film es pot realitzar un anàlisi quantitatiu de les proteïnes detectades mitjançant densitometria (apartat F.6). Per altra banda, si es vol utilitzar la membrana per a la immunodetecció d'una altra proteïna, es pot guardar en PBS a 4°C i sotmetre-la a un procés de *stripping* (apartat F.5).

Proteïna reconeguda	Procedència	Espècie d'origen	Dilució
Mitofusina 2	generat al laboratori ¹	conill	1/500
Mitofusina 2	Abcam ²	ratolí	1/500
Mitofusina 1	cedit pel Dr. Manuel Rojo	conill	1/200
OPA1	BD Transduction	ratolí	1/1000
Drp1	BD Transduction	ratolí	1/1000
Fis1	cedit pel Dr. Yisang Yoon	conill	1/1000
OXPPOS CI: Ndufa9	Molecular Probes	ratolí	1/1000
OXPPOS CII: SdhA	Molecular Probes	ratolí	1/1000
OXPPOS CIII: Uqcrc2	Molecular Probes	ratolí	1/1000
OXPPOS CIII: core I	Molecular Probes	ratolí	1/1000
OXPPOS CIV: Cox I	Molecular Probes	ratolí	1/500
OXPPOS CIV: Cox IV	Molecular Probes	ratolí	1/1000
OXPPOS CV: Atp5a1	Molecular Probes	ratolí	1/1000
Porina	Calbiochem	ratolí	1/5000

Taula 12. Anticossos primaris utilitzats en aquesta tesi doctoral. Les dilucions de tots els anticossos s'han efectuat en la solució de bloqueig (PBS amb un 5% de llet descremada). Els anticossos generats en conill són policlonals i els generats en ratolí són monoclonals. ¹ L'anticòs contra Mfn2 generat en el nostre laboratori s'ha utilitzat bàsicament per a la detecció de la forma truncada de Mfn2. ² L'anticòs contra Mfn2 adquirit a Abcam reconeix l'extrem C-terminal de la proteïna i s'ha utilitzat per detectar la Mfn2 endògena. CI, CII, CIII, CIV i CV es refereixen als complexos de la cadena respiratòria i Ndufa9, SdhA, Uqcrc2, core I, Cox I, Cox IV i Atp5a1 a la subunitat del complex reconeguda per l'anticòs.

F.4) ELECTROFORESI EN CONDICIONS NATIVES: *BLUE NATIVE-PAGE*

La *Blue Native-PAGE* (BN-PAGE) és una de les tècniques més emprades en l'estudi de l'estructura oligomèrica de proteïnes de membrana en condicions natives. Va ser descrita i desenvolupada per Schägger i col·laboradors (Schägger *et al.*, 1991), amb l'objectiu inicial d'aïllar complexos proteics de membrana a partir de mitocondris purificats.

Les proteïnes es solubilitzen a partir de les membranes amb un detergent no iònic que ha de mantenir la conformació nativa i la integritat dels complexos proteics. La càrrega que permet la mobilitat d'aquests complexos en el gel ve conferida pel colorant Coomassie Blue G-250 (CBG; Serva), òptim per resoldre complexos multiproteics. El CBG s'uneix a les proteïnes de membrana solubilitzades. Si la quantitat de CBG utilitzada és òptima, aquest desplaça el detergent provinent de la solubilització tot

conferint càrrega negativa als complexos proteics, minimitzant l'agregació i mantenint les proteïnes solubles.

En aquest tipus d'electroforesi, el gel es prepara amb un gradient lineal d'acrilamida que varia en funció del tamany dels complexos que es volen resoldre. Les mostres es sotmeten a un camp elèctric establert a pH 7,0 i a diferència de l'electroforesi SDS-PAGE, els complexos proteics migren sense cap tipus de restricció fins a trobar un tamany de porus adequat a la seva massa, que correspondrà a la massa molecular aparent del complex, unit al CBG (Schagger *et al.*, 1991).

L'eficiència en la solubilització de proteïnes depèn, a part del tipus i de la quantitat de detergent, de la concentració salina, però la presència d'elevades concentracions de sal en un gel natiu pot causar agregació proteica. Així, en les BN-PAGE, s'ha d'evitar una alta concentració de sals a la mostra i com a substitut s'empra l'àcid aminocaproic (Sigma). Aquest àcid exerceix el mateix efecte que una sal en el procés de solubilització. La presència d'aquest àcid en el gel no és necessària, ja que la càrrega negativa que confereix el CBG és suficient per a la resolució electroforètica dels complexos. No obstant, la seva presència afavoreix la definició de les bandes proteiques (Schagger *et al.*, 1991).

F.4.1) Obtenció de fraccions mitocondrials a partir de múscul esquelètic de ratolí per l'anàlisi *Blue Native*-PAGE

El tampó utilitzat per a l'homogeneïtzació del múscul i l'extracció de mitocondris conté Tris-HCl 10mM, sacarosa 320mM i EDTA 1mM. S'ajusta el pH a 7,4 i s'hi afegeixen els següents inhibidors de proteases: aprotinina 0,14 U/ml, PMSF 1mM, leupeptina 2µM i pepstatina A 2µM. El procediment seguit, a partir de tibialis anterior o gastrocnemius congelats provinents dels diferents models murins emprats, és el següent:

- 1- Es trosseja el múscul congelat amb un bisturí en una placa de petri en gel.
- 2- Es posa el múscul trossejat en el tub de vidre de l'homogeneïtzador, s'afegeix 1ml de tampó i s'homogeneïtza unes 15 vegades amb un èmbol de tefló connectat a un motor *Heidolph RZR 2051 control* a unes 1.800rpm.
- 3- Es recull l'homogenat en un tub de 15ml i es manté en gel.
- 4- S'addicionen 500µl de tampó a l'homogeneïtzador, es torna a homogeneïtzar i aquest homogenat també s'afegeix al tub de 15ml.

5- Es centrifuga l'homogenat 5 minuts a 2.800rpm a 4°C i es recull el sobrenedant en 2 tubs eppendorfs.

6- Es ressuspèn el precipitat en 1 ml de tampó i es repeteix la centrifugació. Es descarta el pellet i el sobrenedant s'ajunta amb l'anterior.

7- Es centrifuga el sobrenedant 10 minuts a 12.800rpm a 4°C. S'aspira el SN i el precipitat obtingut, corresponent a la fracció mitocondrial, es ressuspèn en uns 200µl de tampó.

8- Es valora la concentració de proteïnes amb el mètode del BCA (apartat F.2), es centrifuga 10 minuts a 13.200rpm a 4°C i s'elimina el SN. Els mitocondris precipitats es ressuspenen en un tampó compost per BisTris 50mM, pH 7, i àcid aminocaproic 1,5M per obtenir una concentració de 10 µg/µl de proteïna total. Es fan alíquotes de 100µg i es congelen a -80°C.

F.4.2) Preparació dels gels de gradient

Els gels que contenen un gradient lineal entre el 5 i el 13% d'acrilamida són capaços de separar complexos proteics en un rang de 100 a 1000kDa. Aquests gels s'han utilitzat en aquesta tesi per a la resolució electroforètica dels complexos de la cadena respiratòria. En canvi, per a la detecció dels supercomplexos s'han preparat gels de gradient del 3 al 13% d'acrilamida.

El sistema d'electroforesi emprat ha estat el mateix que en el cas de la SDS-PAGE, és a dir, el Mini-Protean de BioRad. Tots els gels utilitzats han estat de 1,5 mm de gruix.

Per a la preparació dels gels de gradient lineal (del 3 al 13% o del 5 al 13% d'acrilamida) s'ha usat el formador de gradients HoeferTM SG 30 *Gradient Maker* (Amersham Biosciences) connectat a la bomba peristàltica d'un sol canal Minipuls 3 (Gilson), que bombeja la solució cap al sistema d'electroforesi. En aquest apartat es descriu la preparació del gel del 3 al 13% d'acrilamida, però se segueix exactament el mateix protocol en el cas del gel del 5 al 13%. La composició de les solucions per a la preparació dels gels es troba detallada a la taula 13.

Compost	Solució d'acrilamida al 3%	Solució d'acrilamida al 13%	Solució d'acrilamida al 5%	Gel concentrador
acrilamida:bisacrilamida ¹	0,305 ml	0,866 ml	0,61 ml	0,25 ml
Tampó del gel (3x) ²	1,667 ml	1,111 ml	2 ml	1 ml
H ₂ O miliQ	3 ml	0,796 ml	3,35 ml	1,75 ml
Glicerol	---	0,560 ml	---	---
APS 10%	40 µl	14 µl	40 µl	25 µl
TEMED	4 µl	3 µl	3 µl	3 µl

Taula 13. Solucions per a la preparació dels gels de BN-PAGE. ¹ La solució *stock* d'acrilamida: bisacrilamida es prepara dissolent 48 g d'acrilamida i 1,5 g de bisacrilamida en 100 ml d'aigua miliQ. ² El tampó del gel (3X) conté Bis-Tris 150mM i àcid aminocaproic 1,5M (pH 7).

La cubeta formadora del gradient, que consta de dues cambres connectades entre si mitjançant una clau de pas, es col·loca a sobre d'un agitador magnètic. Un cop preparades, les mescles del 3 i del 13% d'acrilamida s'aboquen a les cambres del formador de gradients. La barreja del 13% es posa a la cambra que té sortida directa cap als vidres del sistema, mentre que la del 3% s'afegeix a l'altra cambra. La cambra de la solució més concentrada conté una vareta magnètica.

Un cop afegides les dues solucions a les cambres es posa en marxa la bomba peristàltica a una velocitat constant de 14 rpm. Quan la mescla del 13% ha avançat uns 3 cm del seu recorregut s'obre la clau de pas que comunica les dues cambres. El gradient es forma en mesclar-se la solució menys concentrada amb la solució més concentrada per acció de la vareta magnètica.

Quan el gel queda a una distància de 1,5 cm de la vora superior dels vidres, s'atura el bombeig i s'afegeix una fina capa d'isopropanol per afavorir la polimerització del gel. Es deixa polimeritzar a 4°C tota la nit. Quan el gel ha polimeritzat es decanta l'isopropanol, es deixa assecat i s'afegeix el gel concentrador al 4% d'acrilamida fins al límit superior dels vidres. S'introdueix la pinta i un cop polimeritzat es manté a 4°C fins que es carreguen les mostres.

F.4.3) Preparació de les mostres

En la solubilització de proteïnes de membranes per BN-PAGE és important evitar la presència d'altres concentracions de sals a les mostres, ja que això afavoreix la precipitació del Coomassie i com a conseqüència, de les proteïnes unides a aquest. Les

mostres de proteïnes utilitzades en aquest treball s'han obtingut a partir de mitocondris de múscul esquelètic de ratolí (apartat F.4.1).

Els mitocondris s'han solubilitzat utilitzant detergents suaus, que mantenen els complexos intactes i eviten la disgregació de les proteïnes que els componen, com el DDM, que s'afegeix a una relació de 1,6 mg per mg de proteïna mitocondrial, o la digitonina, que s'addiciona a una ratio de 4 mg per mg de proteïna mitocondrial. El DDM permet aïllar individualment els complexos de la cadena respiratòria, però generalment dissocia les interaccions hidrofòbiques més làbils, disgregant els supercomplexos. La digitonina, en canvi, és un detergent molt suau que permet aïllar estructures supramoleculares de complexos multiproteics i ha estat utilitzada per l'anàlisi dels supercomplexos de la cadena respiratòria.

Així, a cada alíquota de 100µg de mitocondris s'afegeixen 1,6µl de DDM al 10% (p/v) o 4µl de digitonina al 10% (p/v). Les mostres s'incuben en gel durant 5 minuts i es centrifuguen 30 minuts a 13.200 rpm a 4°C. Es recull el sobrenedant i es manté en gel. Seguidament se l'hi afegeix 1/3 del seu volum de tampó de càrrega, compost per Blue G 5% (p/v) en àcid aminocaproic 1M, i es mescla bé amb la pipeta.

F.4.4) Electroforesi en condicions natives

Es munten el gels de gradient ja polimeritzats en el sistema d'electroforesi i, a la cambra freda, s'afegeix el tampó del càtode (Tricina 50 mM; Bis-Tris 15 mM; pH 7 i Blue G 250 al 0,02% (p/v)) a la cambra interna i el tampó de l'ànode (Bis-Tris 50 mM, pH 7) a la cambra externa de la cubeta.

Es carreguen les mostres en el gel i es connecta a una font d'alimentació, tot a la cambra freda. L'electroforesi es deixa córrer a un voltatge constant de 90V durant uns 30 minuts, fins que la mostra hagi entrat completament en el gel de gradient. En aquest punt, es canvia el voltatge a 150V, es limita l'amperatge a 15mA i es deixa córrer durant unes 2 hores, fins que el colorant surt del gel. En aquest moment ja es poden visualitzar els complexos i supercomplexos per tinció amb Coomassie.

F.4.5) Western Blot

Una vegada acabada l'electroforesi es desmunta el gel i s'equilibra en tampó de transferència (composició descrita a l'apartat F.3.2) durant 10-15 minuts. La

transferència es realitza de la mateixa manera que la d'un gel SDS-PAGE, però fixant un voltatge constant de 100V durant 1 hora i 30 minuts. La transferència es realitza a temperatura ambient i col·locant la cubeta sobre un agitador magnètic.

Després de transferir-se les proteïnes, s'elimina el Coomassie Blue G de la membrana amb solució destenyidora (àcid acètic 10% i metanol 50%) efectuant dos rentats de 5 minuts cadascun. Aquesta membrana ja pot emprar-se per realitzar la immunodetecció de les proteïnes d'interès (apartat F.3.3). En aquesta tesi doctoral s'han utilitzat anticossos contra diferents subunitats dels complexos de la cadena respiratòria per a la detecció tant dels complexos en conformació nativa com dels supercomplexos (Taula 12).

F.5) STRIPPING

Aquest procés es basa en la desnaturalització, per temperatura i agents reductors, dels anticossos presents a la membrana per poder-la incubar amb nous anticossos primaris:

- 1- S'incuba la membrana durant 30 segons amb metanol i es renta 10 minuts en PBS.
- 2- S'incuba la membrana en tampó de *stripping* (Tris-HCl 62,5 mM; pH 6,8, SDS 2% i β -mercaptoetanol 100 mM) durant 30 minuts en un bany a 50°C. Aquesta solució es prepara sota la campana de gasos i el procés es realitza en recipients tancats hermèticament, ja que el β -mercaptoetanol emet gasos tòxics.
- 3- Es retira el tampó, es fa un rentat de la membrana amb PBS i 3 rentats de 10 minuts a temperatura ambient amb una solució de PBS-Tween20 al 0,1% (v/v). Es torna a bloquejar la membrana i s'incuba amb l'anticòs primari desitjat continuant el protocol descrit en l'apartat F.3.3.

F.6) ANÀLISI DENSITOMÈTRICA

Aquest tipus d'anàlisi és àmpliament utilitzat per estudiar els nivells d'una determinada proteïna a partir de la seva immunodetecció per *Western Blot*. Els films revelats es digitalitzen mitjançant l'ús d'un escàner (HP *photosmart*). Per quantificar el senyal corresponent a una banda en el film s'ha emprat el *software* Gene Tools (SynGene). Per a la quantificació s'ha agafat el valor del *Raw Volume*. Aquest valor té en compte no només la intensitat del senyal sinó també la quantitat total de senyal. D'aquesta manera bandes més estretes però més fosques tindran un valor similar

d'expressió a bandes el doble d'amples però la meitat d'intenses. En totes les densitometries també es va seleccionar una zona del film on no hi havia detecció específica; el valor obtingut fou considerat soroll de fons (*background*) i el programa el processà i el restà dels valors de *Raw Volume*. Els valors de *Raw volume* amb el *background* corregit són els valors emprats en aquesta tesi per definir els nivells d'expressió de proteïnes.

F.7) MICROSCOPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ

En la present tesi doctoral, aquesta tècnica s'ha utilitzat per analitzar la morfologia i l'estructura dels mitocondris de les fibres musculars dels diferents models murins emprats. En el cas del model d'expressió transitòria de la forma hMfn2 Δ 614-757 s'ha utilitzat el múscul tibialis anterior i en el cas del model *knockdown* de Mfn2 el quàdriceps. A la Unitat de Microscopia electrònica dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona s'encarreguen de realitzar els talls semifins i ultrafins de les mostres, així com del seu muntatge a les reixetes per tal de ser observades al microscopi electrònic de transmissió. Correspon a l'usuari la preparació de la mostra i l'obtenció de les fotografies de les mostres ja tallades.

F.7.1) Preparació de les mostres

El protocol d'obtenció de les mostres es realitza a la campana d'extracció de gasos ja que s'utilitzen productes molt tòxics, com el paraformaldehid i l'osmi. Tot el material necessari (tampons, tubs, bisturís...) ha estat proporcionat per la Unitat de Microscopia electrònica. El procediment és el següent:

1- S'anestesiïen els ratolins mitjançant una injecció intraperitoneal d'una solució de ketamina / xilacina (100 i 10 mg/kg pes corporal, respectivament).

2- Es preparen els tubs amb solució fixadora (paraformaldehid 2% i gluteraldehid 2,5% en tampó fosfat 0,1M) i es deixen en gel. Es posa una gota de solució fixadora sobre la resina que servirà de suport per tallar els músculs, també en gel.

3- S'extreu el múscul d'interès i immediatament es posa sobre la gota de solució fixadora. És molt important que el múscul no s'assequi en cap moment.

4- Amb l'ajuda d'una lupa binocular, es va tallant el múscul en trossets petits amb un bisturí. És important fixar-se en l'orientació dels talls depenent del tipus d'imatges que

es vulguin obtenir (seccions transversals o longitudinals). S'han d'obtenir talls el més petits possibles per facilitar l'osmificació de tot el teixit.

5- S'agafen aquests trossets amb les pinces, amb molta cura per no danyar el teixit, i es col·loquen en els tubs corresponents. Es deixen en gel fins que s'han obtingut totes les mostres.

6- Es canvia la solució fixadora dels tubs i s'incuben 16 hores a 4°C.

7- Es realitzen 3 rentats de 10 minuts i 3 rentats més de 30 minuts cadascun amb tampó fosfat 0,1M, en gel i en agitació.

8- Osmificació: s'afegeixen als tubs 1,5 ml d'una solució d'osmi 1% en tampó fosfat 0,1M, i s'incuben durant 2 hores en gel i en agitació.

9- Es realitzen 3 rentats de 10 minuts amb tampó fosfat 0,1M i s'incuben durant 16 hores a 4°C .

10- Deshidratació amb acetona: es realitzen incubacions amb concentracions creixents d'acetona (1x10 min amb acetona 50%; 2x10 min amb acetona 70%; 3x10 min amb acetona 90%; 3x10 min amb acetona 96% i 3x15 min amb acetona 100%). Totes les incubacions s'efectuen en gel i en agitació.

11- Infiltració en reïna EPON12: es realitzen incubacions successives, d'1 hora a temperatura ambient i en agitació, amb concentracions creixents de reïna EPON12 en acetona (Relació volum reïna: volum acetona 1:3; 2:2 i 3:1). Per últim es realitza una incubació amb reïna EPON12 durant 2 hores, es fa un canvi de reïna i s'incuba 16 hores a temperatura ambient en un agitador orbital.

12- Es realitza un nou canvi de reïna EPON12 i s'incuba 2h a temperatura ambient.

13- S'aspira aquesta reïna, s'afegeix EPON12 amb el catalitzador DMP-30 i s'incuba durant 16 hores a temperatura ambient en un agitador orbital.

14- Es realitza un nou canvi d'EPON12 amb DMP-30 i s'incuba un mínim de 2h a temperatura ambient, en agitació.

15- Es col·loca un trosset de teixit a cadascun dels extrems del motlle, en l'orientació desitjada. S'omple el motlle amb EPON12 + DMP-30 i s'incuba almenys 48h a 70°C.

A partir d'aquest moment ja es poden realitzar els talls semifins en un ultramicrotòmm (Leica) i posteriorment els talls ultrafins que es recullen en reixetes de coure recobertes amb Formvar i carboni. Els talls ultrafins s'han observat en el microscopi electrònic de transmissió JEOL 1010 amb sistema de digitalització d'imatges Bioscan (Gatan), ubicat a la Unitat de Microscopia electrònica dels Serveis Científic-Tècnics de la UB.

G) TÈCNiques DE DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

El treball amb àcids nucleics o bacteris requereix la utilització de material estèril per evitar contaminacions amb DNAses, RNAses, altres bacteris o ADN's aliens. Aquest material s'esterilitza a l'autoclau a 1 atmosfera de pressió durant 20 minuts. Per altra banda, la manipulació de bacteris es realitza al costat d'un bec Bunsen, que proporciona una àrea de treball estèril minimitzant així el risc de contaminació. Les solucions utilitzades en els diferents protocols es preparen en aigua ultrapura obtinguda amb el sistema MiliQ de Millipore, i s'esterilitzen a l'autoclau o per filtració mitjançant filtres de 0,22µm de diàmetre de porus.

G.1) VECTORS PLASMÍDICS: AMPLIFICACIÓ I PURIFICACIÓ

Els plàsmids són molècules d'ADN circular que poden ser introduïts en bacteris sense ser degradats. El ràpid creixement dels bacteris, juntament amb el fet que la introducció del vector els confereix un avantatge selectiu de creixement, per exemple la resistència a un antibiòtic present al medi, fa que se'n produeixin milers de còpies en poc temps.

La producció d'aquests plàsmids comporta la generació de bacteris competents per a la incorporació d'ADN plasmídic, la transformació d'aquests bacteris amb el plàsmid, la selecció i amplificació d'una colònia de bacteris transformants i la purificació del plàsmid a partir d'aquests.

G.1.1) Transformació de bacteris competents per xoc tèrmic

La generació de bacteris competents a partir de les soques d'*E.coli* DH-5α Dam⁻/Dmc⁻ i XL1-Blue, així com la preparació dels medis de creixement dels bacteris (LB líquid o plaques de LB-agar amb els antibiòtics corresponents) han estat realitzades per l'equip tècnic del laboratori.

El protocol utilitzat per a la transformació dels bacteris competents ha estat el següent:

1- S'addicionen aproximadament entre 50 i 100 ng del plàsmid d'interès a una alíquota de 100 µl de bacteris competents i es manté en gel durant 20 minuts. Aquest fet permetrà l'adsorció de l'ADN a la superfície dels bacteris.

2- S'incuba la mescla d'ADN i bacteris a 42°C durant 90 segons i es torna a posar en gel durant 2 minuts.

3- S'afegeixen 500 µl de medi LB i s'incuben a 37°C durant 1 hora en agitació. Durant aquest temps els bacteris que han incorporat el plàsmid comencen a expressar la resistència a l'antibiòtic que permetrà la seva selecció.

4- Es sembren 100 µl en una placa de LB-agar suplementada amb l'antibiòtic corresponent i s'incuba a 37°C durant 16 hores. Les colònies apareixen entre les 12 i les 18 hores.

G.1.2) Purificació de plàsmids a partir de cultius bacterians

Es selecciona una colònia de la placa i es fa créixer en medi líquid amb l'antibiòtic corresponent durant 16 hores a 37°C, en agitació. A partir d'aquest cultiu bacterià es purifiquen els plàsmids, utilitzant diferents *kits* comercials en funció de la quantitat i la qualitat d'ADN que es necessiti. En aquesta Tesi ha estat necessària l'obtenció de grans quantitats d'ADN plasmídic lliure d'endotoxines. Per assolir aquest objectiu s'ha utilitzat l'*EndoFree Plasmid Mega kit* de Qiagen (apartat C.1.1.3 de Materials i Mètodes).

G.2) ELECTROFORESI EN GELS D'AGAROSA

L'electroforesi en gel d'agarosa és un mètode estàndard emprat per a separar fragments d'ADN. La migració d'aquests fragments en el gel és inversament proporcional al logaritme de la seva massa molecular. El percentatge d'agarosa que s'utilitza depèn del tamany dels fragments que cal separar. Generalment s'utilitzen gels del 1% d'agarosa, que permeten la separació de fragments d'entre 0,4 i 6 Kb. Per a la separació de fragments més petits es fan servir gels del 2,5-3% d'agarosa. Per a la preparació dels gels i per dur a terme l'electroforesi s'ha utilitzat el tampó TAE (Tris base 40mM, acètic glacial 20mM i EDTA 1mM, pH 8,5). L'electroforesi es corre a un voltatge constant de 90 V en el cas dels gels del 1% d'agarosa i a 70 V en els gels del 3% d'agarosa. En paral·lel a les mostres es corren marcadors de pes molecular. Per

visualitzar els fragments d'ADN s'ha utilitzat bromur d'etidi i un transil·luminador de llum ultraviolada acoblat a una càmera per captar la imatge. Cal tenir en compte que el bromur d'etidi és un agent cancerigen.

G.3) POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa permet amplificar específicament molècules d'ADN per acció de l'enzim ADN polimerasa i gràcies als encebadors, dues molècules d'ADN que delimiten la regió a amplificar. Aquesta tècnica també permet afegir al producte d'amplificació extrems compatibles amb dianes d'enzims de restricció, fet que possibilita la seva clonació entre les dianes específiques dels vectors.

G.3.1) Disseny dels encebadors

El primer pas abans de realitzar una PCR és dissenyar els encebadors que permetran l'amplificació específica d'un producte. En la present tesi doctoral el disseny s'ha realitzat utilitzant el programa *Primer Select* (Lasergene) i seguint els següents criteris:

- 1- La longitud de l'encebador ha de ser d'entre 15 i 30 parells de bases.
- 2- Els encebadors no han de formar dímers entre ells ni estructures secundàries o *hairpins*. Normalment es consideren bons els encebadors en què la formació d'aquesta estructura té una energia lliure de Gibbs (ΔG) igual o major a -3,1.
- 3- Han de tenir una temperatura de dissociació (*melting*) entre 52-55°C i permetre la hibridació a 55-60°C. Com més alta sigui la temperatura d'hibridació més específica serà la unió, però la PCR pot resultar menys eficient.
- 4- No han de contenir repeticions de nucleòtids, per evitar que l'ADN polimerasa sintetitzi de manera errònia el producte a amplificar.
- 5- El contingut de C/G ha d'estar al voltant del 40-60% i preferiblement, els extrems 3' dels encebadors han de contenir una C o una G. Això és degut a què entre C i G es formen 3 ponts d'hidrogen, generant una interacció més estable.

G.3.2) Etapes de la PCR i components de la reacció

Generalment la PCR consisteix en una sèrie de 20-40 cicles, en cadascun dels quals hi podem distingir tres etapes: la desnaturalització de l'ADN a 95°C, la hibridació dels

encebadors amb l'ADN motlle i l'elongació de la cadena. La temperatura d'hibridació depèn de les característiques dels encebadors emprats; sol estar entre 50-60°C, mentre que la temperatura i el temps d'elongació depenen de la polimerasa utilitzada i de la longitud del fragment que es vol amplificar. Habitualment el pas d'elongació es realitza a una temperatura propera als 72°C i el temps aproximat és de 30 a 60 segons. Els cicles solen anar precedits per un únic pas inicial per desnaturalitzar l'ADN. Aquest pas o *Hot start* es realitza a 95°C durant uns 5 minuts. Un cop finalitzats tots els cicles de la PCR, hi ha un pas d'elongació final, a 72°C durant 5-10 minuts, per assegurar que totes les molècules d'ADN s'han sintetitzat completament.

La PCR es duu a terme en un termociclador, en un volum final de reacció de 10-50 µl. Els components necessaris per realitzar la PCR són l'ADN motlle, el parell d'encebadors, l'ADN polimerasa, els dNTPs (barreja que conté dATP, dTTP, dCTP i dGTP) i el tampó òptim per l'activitat i estabilitat de la polimerasa. Segons la finalitat de la PCR s'utilitzen diferents tipus de polimerases, com la Taq, més processiva o la Pfu, de més alta fidelitat. En cada reacció de PCR es solen posar entre 100 i 200 ng d'ADN motlle mentre que la concentració d'encebadors és variable (100-500 nM aproximadament). Les condicions de la PCR s'han d'optimitzar sempre per cada parell d'oligonucleòtids.

G.4) REAL-TIME PCR (RT-PCR)

La PCR a temps real és un mètode que ens permet estimar els nivells d'ARN missatger presents en una mostra mitjançant la quantificació del cDNA sintetitzat *in vitro* a partir de l'ARN a mesurar. En aquesta tesi la RT-PCR ha estat utilitzada per mesurar els nivells d'expressió de diferents gens tant en cèl·lules C2C12 com en múscul esquelètic dels diferents models murins emprats.

G.4.1) Obtenció d'ARN total i síntesi de cDNA

A l'hora de treballar amb ARN cal ser molt més curós que amb l'ADN degut a l'abundant presència de RNAses a l'ambient, sobretot a la pell i a la pols ambiental. Per aquest motiu s'ha de treballar sempre amb guants i amb material lliure de RNAses. És important doncs, que el primer pas d'homogeneïtzació de les cèl·lules o teixits per obtenir ARN es realitzi en presència d'inhibidors de RNAses.

G.4.1.1) Obtenció d'ARN total a partir de cèl·lules C2C12

Per obtenir ARN a partir de cèl·lules en cultiu s'ha emprat el *RNAeasy mini kit* (Qiagen), que es basa en la purificació de l'ARN total per la seva unió específica a columnes de silici. Aquest mètode és l'òptim per mostres que s'analitzaran per *Real-Time* PCR, ja que s'obté un ARN de molt bona qualitat (manifestada per la relació d'absorbàncies a 260 i 280 nm i l'absència de restes d'etanol o isopropanol, com ho demostren els baixos valors d'absorbància a 220 nm obtinguts). Per altra banda, en aquest protocol hi ha un pas de tractament amb DNAsa I que elimina qualsevol resta d'ADN genòmic. L'ARN s'ha purificat a partir de cèl·lules C2C12 a dia 5 de diferenciació crescudes en plaques de 6 pous. La concentració d'ARN obtingut es valora mesurant l'absorbància a 260 nm al *NanoDrop*. L'ARN es guarda congelat a -80°C.

G.4.1.2) Obtenció d'ARN total a partir de múscul esquelètic de ratolí

El procediment emprat per obtenir ARN de múscul esquelètic és un protocol que combina l'ús del reactiu Trizol (Invitrogen) amb el *RNAeasy mini kit* (Qiagen). Aquest mètode es basa en l'extracció orgànica d'ARN amb fenol/cloroform/isotiocianat de guanidini i la posterior unió a les columnes del *kit*.

Breument, s'afegeixen 500 µl de reactiu Trizol al vial amb el múscul congelat (tibialis o gastrocnemi) i s'homogeneïtza amb el politró. S'incuba 5 minuts a temperatura ambient i es passa l'homogenat a un tub eppendorf amb 100 µl de cloroform. S'agita per inversió, s'incuba 3 minuts a temperatura ambient i es centrifuga 15 minuts a 12000 rpm a 4°C. Es recull la fase aquosa que conté l'ARN i es passa a un eppendorf amb el mateix volum d'etanol 70%. Es barreja per inversió, es carrega aquest volum a les columnes del kit i a partir d'aquest moment es continua el protocol descrit per la casa comercial. Amb la combinació d'aquests dos mètodes s'eviten possibles problemes de degradació de l'ARN i s'obté un bon rendiment. La concentració d'ARN obtingut es valora mesurant l'absorbància a 260 nm al *NanoDrop*. L'ARN es guarda congelat a -80°C.

G.4.1.3) Síntesi de cDNA a partir d'ARN total

La síntesi de cDNA a partir de les mostres d'ARN total purificat s'ha realitzat utilitzant l'encebador oligo dT (Invitrogen) i l'enzim transcriptasa reversa. L'oligo dT s'uneix a la cua de poliA dels diferents ARN missatgers i l'enzim sintetitza el cDNA a partir de l'oligo dT, emprant com a motlle l'ARN missatger. El protocol utilitzat ha estat el mateix tant per l'ARN provinent de cèl·lules com de teixits.

S'ha utilitzat el *kit SuperScript II Rnase H-Reverse Transcriptase* (Invitrogen) juntament amb l'inhibidor de RNases *RNaseOUT* (Invitrogen). S'ha efectuat la retrotranscripció de 2 µg d'ARN total seguint les indicacions del *kit*. La reacció de síntesi té lloc en 20 µl totals; per tant, considerant que l'eficiència de la retrotranscripció és del 100%, la concentració obtinguda de cDNA és de 100 ng/µl. El cDNA sintetitzat es conserva congelat a -20°C.

Per comprovar que la síntesi s'ha produït correctament s'empra part de la solució de la mateixa com a motlle d'una PCR i es verifica la presència de cDNA amplificat mitjançant un gel d'agarosa. Si la síntesi ha funcionat, s'amplificarà el cDNA i es visualitzarà la banda del tamany corresponent al gel d'agarosa. Normalment s'utilitzen les mateixes condicions de PCR que les emprades en la *Real-Time* PCR (apartat G.4.2 de Materials i Mètodes).

G.4.2) Fonament de la RT-PCR i mètodes de quantificació

El número de molècules d'ADN inicials determina la quantitat de còpies sintetitzades durant una PCR. Per tant, a més còpies de cDNA inicial, més còpies d'ADN s'aniran generant durant la PCR. De totes maneres, arriba un moment en què el sistema de detecció es satura i no es poden observar diferències en la quantitat d'ADN amplificat entre mostres amb diferents quantitats d'ADN motlle inicial (*plateau* o fase de saturació). Empíricament, i per la majoria de gens, això sol passar entre els cicles 35 i 40 de la PCR. Per tant, només si se segueix a temps real (*real-time*) la reacció d'amplificació, en un determinat rang de cicles, és possible distingir quines mostres partien d'un número més gran de molècules de cDNA. Així, les mostres amb un major número inicial de molècules de cDNA motlle necessitaran menys cicles de PCR per arribar a un determinat valor de quantitat d'ADN detectat. O, el que és el contrari,

aquella mostra que tingui menys quantitat de molècules de cDNA motlle, necessitarà més cicles per aconseguir obtenir la mateixa quantitat de molècules d'ADN.

Els paràmetres detectats per la RT-PCR són el número de cicles (Ct) i la quantitat d'ADN amplificat. Perquè sigui correcta la comparació dels valors de Ct entre diferents mostres, és molt important obtenir aquest valor en el moment en què la relació entre els Ct i la quantitat d'ADN amplificat és lineal en totes les mostres a mesurar i comparar. Per tant, el valor de Ct sempre es calcula per una determinada quantitat fixa d'ADN. La detecció de l'ADN amplificat es fa mitjançant dues metodologies diferents segons els compostos utilitzats:

- **Sybr Green**® (Applied Biosystems): aquest compost s'uneix específicament a l'ADN de doble cadena emetent fluorescència quan hi està unit. Com que el cDNA i els encebadors són molècules de cadena senzilla, aquest compost només s'unirà als productes d'amplificació. Per aquest motiu, els encebadors dissenyats per aquest mètode no han de formar dímers (apartats G.3.1 i G.4.3.1 de Materials i Mètodes). El *Sybr Green* emprat es ven en forma d'una *master mix* que ja conté l'ADN polimerasa i els dNTPs necessaris per l'amplificació (*SYBR Green PCR Master Mix*). Els encebadors, en canvi, s'han d'afegir i han estat dissenyats i testats al laboratori.

- **Taqman**® (Applied Biosystems): en aquest cas, la fluorescència també es detecta mentre es va sintetitzant la molècula d'ADN, tot i que el fonament del mètode és diferent. Es tracta d'una sonda que hibrida amb el cDNA a la regió intermèdia entre els dos encebadors. Aquesta sonda té la particularitat que conté un *quencher* (TAMRA) i un fluoròfor (FAM), un a cada extrem de la mateixa. El *quencher* absorbeix la fluorescència emesa pel fluoròfor i, per tant, quan la sonda està sencera i hibridada a l'ADN no hi ha detecció de la fluorescència. Quan comença l'amplificació, l'activitat 5' 3' exonucleasa de l'ADN polimerasa hidrolitza la sonda unida, allunyant el *quencher* del fluoròfor i permetent l'emissió i detecció de la fluorescència. En aquest mètode la generació de dímers per part dels encebadors no afecta a la quantificació. La barreja amb els encebadors i la sonda es poden adquirir, per cada gen, a Applied Biosystems (*TaqMan gene expression assays*). A part de la solució amb la sonda, també es va emprar una *master mix*, amb els reactius necessaris per la PCR (*TaqMan*® *Universal PCR Master Mix*, Applied Biosystems).

G.4.3) RT-PCR utilitzant Sybr Green

G.4.3.1) Disseny dels encebadors

El primer pas és el disseny d'encebadors per amplificar el gen d'interès. Les normes són les mateixes que per uns encebadors convencionals de PCR (sobretot és essencial que no formin dímers entre ells, ni *hairpins*, ja que seran quantificats) però, a part, hi ha quatre normes addicionals:

1- Els encebadors no es poden unir a altres gens o cDNAs presents en les bases de dades. Aquest fet es verifica utilitzant el programa *on-line* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://www.ncbi.nih.gov/blast>).

2- El producte d'amplificació ha de tenir entre 80-150 parells de bases. Això permet augmentar l'eficiència d'amplificació a cada cicle de PCR, millorant per tant la precisió de la quantificació. Alhora, s'ha de trobar la concentració òptima d'encebadors per realitzar l'amplificació (normalment es troba entre 150 i 300 nM). La validesa dels encebadors es determina mitjançant una PCR convencional utilitzant diferents concentracions de *primers*. Es verifica la presència de la banda del tamany esperat, l'absència de bandes contaminants o dímers d'encebadors i una quantitat creixent del producte amplificat a mesura que augmenta la quantitat de *primers*.

3- Els encebadors han d'hibridar en diferents exons del gen a mesurar. Tot i que els mètodes de purificació d'ARN eviten contaminacions d'ADN genòmic que no ho fan obligatori, aquest disseny assegura que els encebadors seran incapaços d'amplificar ADN genòmic, cosa que interferiria en la quantificació.

4- L'amplificació portada a terme per una parella d'encebadors ha de presentar un pendent de -3,321 en la relació lineal entre el logaritme dels ng equivalents de cDNA posats a amplificar (eix X) i el nombre de cicles (eix Y). Aquest valor de pendent s'obté de la quantificació, per *real-time PCR*, d'un banc de dilucions successives de cDNA. Aquest valor de -3,321 significa que els encebadors han amplificat a cada cicle el 100% de còpies d'ADN. Per tant, com més proper sigui aquest valor a -3,321, més eficients i bons seran els encebadors. Pendents amb valors de fins a -3,45 són acceptables. Pendents amb valors més petits de -3,31 poden atribuir-se a la presència de dímers d'encebadors o de contaminants en la PCR. El càlcul del pendent es realitza per cada gen que es vol mesurar.

G.4.3.2) Procediment

La reacció de PCR s'ha realitzat en plaques de 384 pous amb un volum final de 10 µl per pou, i cada mostra per duplicat. Cada pou contenia entre 5 i 10 ng de cDNA, el parell d'encebadors a una concentració de 150-300 nM cadascun, la *SYBR Green PCR Master Mix* i aigua miliQ fins a 10 µl. La *real-time* PCR consta d'un primer pas de 10 minuts a 95°C i de 40 cicles de 2 etapes: una de 15 segons a 95°C i una d'1 minut a 60°C. Després dels 40 cicles, el termociclador afegeix una etapa de *melting* o dissociació. Aquesta etapa el que fa és dissociar el producte d'ADN obtingut mitjançant l'augment gradual de temperatura. La dissociació es detectarà com la pèrdua de fluorescència i quedarà representada com una corba. La temperatura de *melting* o dissociació és específica per cada molècula d'ADN. Això significa que si hi ha un sol producte d'amplificació hi haurà una sola corba de *melting*. Per tant, és una manera de verificar que només s'ha amplificat un sol cDNA. La metodologia del Sybr Green s'ha utilitzat per determinar els nivells dels gens *housekeeping* (apartat G.4.5) i per a la quantificació de l'ADN mitocondrial (apartat G.5).

El termociclador utilitzat per realitzar la *Real-Time PCR* ha estat el model Abi-Prism 7900 HT (Applied Biosystems) que es localitza a la Unitat de Genòmica dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

G.4.4) RT-PCR utilitzant TaqMan

Es poden adquirir les sondes a la casa comercial Applied Biosystems per qualsevol dels gens identificats en les bases de dades. L'eficiència d'aquests encebadors sempre està al voltant del 100%, de manera que no és necessari testar ni optimitzar les seves concentracions. En aquesta tesi, s'ha determinat l'expressió de les diferents subunitats dels complexos OXPHOS amb sondes Taqman. Per determinar els nivells d'expressió de Mfn2 també s'han utilitzat sondes Taqman.

La reacció de PCR utilitzant les sondes Taqman també s'ha realitzat en plaques de 384 pous amb un volum final de 10 µl per pou. Cada pou contenia entre 5 i 10 ng de cDNA, la solució de la sonda (s'adquireix 20X i en la reacció ha de quedar 1X), la *TaqMan Universal PCR Master Mix* i aigua miliQ fins a 10 µl. El termociclador utilitzat i les condicions de la RT-PCR són exactament les mateixes que en el cas del Sybr Green, però seleccionant el fluoròfor corresponent.

G.4.5) Gens housekeeping i controls negatius

En paral·lel als gens dels quals volem calcular l'expressió, també es determinen els nivells dels gens anomenats *housekeeping*, que són gens d'expressió molt abundant i constant en diferents tipus de mostres. Acostumen a ser gens estructurals com la β -Actina, l'ARP o l'enzim de la glucòlisi GAPDH. D'aquesta manera, els valors d'expressió obtinguts per un gen determinat s'han referit sempre al valor del *housekeeping*, és a dir, que es tracta d'una quantificació relativa. En aquesta tesi s'ha utilitzat la β -Actina com a gen *housekeeping*; els encebadors emprats foren dissenyats pel Dr. Marc Liesa i s'utilitzen a una concentració de 150 nM. La seqüència d'aquests primers es troba en la seva tesi doctoral (Liesa, 2008).

Com a qualsevol experiment, la *Real-Time PCR* ha de contenir controls negatius. El primer i obvi, com a qualsevol reacció de PCR, és fer una reacció amb tots els components necessaris però afegint aigua miliQ enlloc de la solució de cDNA. Aquest control negatiu serveix per comprovar que cap dels reactius ni materials emprats estan contaminats amb cDNA. El segon control, i que és molt important en els casos de mesura per Sybr Green amb encebadors que només hibriden en un exó, és afegir la dilució corresponent de l'ARN enlloc de la dilució de cDNA (o sigui, un control negatiu de retrotranscripció, amb tots els reactius menys la retrotranscriptasa). Aquest és un control de la presència d'ADN genòmic a la mostra, ja que si hi ha amplificació, només pot venir d'aquest.

G.4.6) Càlcul de l'expressió gènica

En els dos casos, Sybr Green i Taqman, el càlcul dels valors d'expressió es realitza amb el mètode de ΔCt . Els valors d'expressió d'un gen són relatius als valors d'expressió d'un altre gen *housekeeping* (apartat G.4.5 de Materials i Mètodes). Per tant, en el cas que tots els encebadors (gen d'interès i *housekeeping*) amplifiquin amb una eficiència del 100%, es pot aplicar la següent fórmula:

$$\text{Expressió del gen d'interès relatiu al } housekeeping = 2^{-(Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{housekeeping}})} = 2^{-\Delta Ct}$$

L'eficiència dels encebadors del *housekeeping* i del gen a mesurar ha de ser la mateixa i del 100%, perquè sinó, no és cert que a cada cicle es dupliqui el contingut d'ADN. Per tant, es poden emprar els valors de mesures realitzades per Sybr Green i

TaqMan sempre que les eficiències siguin les mateixes. L'avantatge d'aquest mètode és que no cal fer recta patró, estalviant per tant molt reactiu, temps i diners.

G.5) QUANTIFICACIÓ DE L'ADN MITOCONDRIAL PER RT-PCR

La quantificació de l'ADN mitocondrial (mtDNA) de múscul esquelètic dels diferents models animals emprats s'ha realitzat mitjançant *Real-Time* PCR. Es tracta d'un mètode de quantificació relativa, en què es calcula el número de còpies d'ADN mitocondrial respecte el contingut d'ADN nuclear (nDNA). El fonament de la RT-PCR és el mateix que el descrit a l'apartat G.4 amb la diferència que s'amplifica ADN genòmic enlloc de cDNA.

G.5.1) Obtenció d'ADN total a partir de múscul esquelètic

El protocol utilitzat per obtenir ADN total a partir de múscul esquelètic de ratolí combina la digestió del múscul amb proteïnasa K i l'ús del *DNAeasy blood and tissue kit* (Qiagen). Es parteix aproximadament d'uns 25 mg de teixit congelat, als quals s'afegeix 290 µl de tampó de lisi i 10 µl de proteïnasa K d'una solució *stock* de 20mg/ml. La composició del tampó de lisi és Tris-HCl 100 mM pH 8,5; NaCl 200 mM; SDS 0,2% (p/v) i EDTA 5mM. S'incuben a 56°C durant 16 hores en agitació. El dia següent es centrifuga 15 minuts a 13000 rpm, es recull el sobrenedant en un nou eppendorf i es descarta el pellet. S'afegeixen 300 µl del tampó "AL" del *kit* i es barreja amb el vòrtex. S'afegeixen 300 µl d'etanol, s'agita per inversió i es passa tot a les columnes del *kit*. A partir d'aquest moment es segueix el protocol recomanat per la casa comercial. L'ADN purificat s'elueix en 100 µl d'aigua miliQ i es valora la seva concentració i puresa al *NanoDrop*. Es congela a -20°C.

G.5.2) Disseny dels encebadors, procediment i càlcul

S'han de dissenyar un parell d'encebadors que amplifiquin un fragment d'un gen o regió d'ADN mitocondrial i un parell d'encebadors que amplifiquin un gen codificat pel nucli. Les normes d'aquest disseny són les mateixes que les descrites en l'apartat G.4, tot i que en aquest cas els oligonucleòtids si que poden hibridar amb els introns dels gens nuclears. En el cas de l'ADN nuclear, s'han d'escollir encebadors que hibridin

amb gens de còpia única i evitar pseudogens, ja que la seva amplificació podria interferir en la quantificació. Com en el cas de la *Real-Time* PCR convencional, s'ha d'optimitzar la concentració d'encebadors a utilitzar i s'ha de comprovar la presència d'un sol producte d'amplificació en un gel d'agarosa.

El gen nuclear i el mitocondrial amplificats han estat *SdhA* (Succinat deshidrogenasa A) i *Cox2* (subunitat II del complex IV), respectivament. Per a l'amplificació de l'ADN mitocondrial també s'han utilitzat un parell d'oligonucleòtids que amplifiquen un fragment de 140 pb comprès entre les posicions 1212 i 1352 de la seqüència d'ADN mitocondrial, i que hem anomenat mitDNA. Les seqüències dels encebadors utilitzats es mostren a la taula 14.

La reacció de PCR s'ha realitzat en plaques de 384 pous amb un volum final de 10 µl per pou. Cada pou contenia entre 0,1 i 1 ng d'ADN total, el parell d'encebadors corresponents a 250 nM cadascun i el reactiu *SYBR Green PCR Master Mix*. Les condicions de la RT-PCR són exactament les mateixes que les descrites a l'apartat G.4.3.

El càlcul del número de còpies d'ADN mitocondrial en relació a la quantitat d'ADN nuclear s'ha realitzat amb el mètode de ΔCt , utilitzant el gen nuclear com a *housekeeping*. Així, sempre que l'eficiència dels dos parells de primers sigui del 100%, es pot aplicar:

$$\text{Ratio mtDNA / nDNA} = 2^{-(Ct \text{ gen mitocondrial} - Ct \text{ gen nuclear})} = 2^{-\Delta Ct}$$

Els resultats obtinguts amb els dos parells de *primers* (*Cox2* o mitDNA) ha estat el mateix.

Encebadors	Seqüència
<i>SdhA forward</i>	TACTACAGCCCCAAGTCT
<i>SdhA reverse</i>	TGGACCCATCTTCTATGC
<i>Cox2 forward</i>	CTACAAGACGCCACAT
<i>Cox 2 reverse</i>	GAGAGGGGAGAGCAAT
<i>mitDNA forward</i>	ACCGCAAGGGAAAGATGAAA
<i>mitDNA reverse</i>	AGGTAGCTCGTTTGGTTTCGG

Taula 14. Seqüència dels encebadors utilitzats per a la quantificació de l'ADN mitocondrial. Les seqüències dels *primers* pels gens *SdhA* i *Cox2* s'han obtingut de Moreno-Loshuertos *et al.*, 2006. El parell d'encebadors mitDNA han estat dissenyats durant la realització d'aquesta tesi.

BIBLIOGRAFIA

- Acín-Pérez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernández-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Pérez-Martos A, Bruno C, Moraes CT, Enriquez JA. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol. Cell* 13, 805-815.
- Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* 32, 529-539.
- Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension* 53, 885-892.
- Aihara H, Miyazaki J. (1998). Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat. Biotechnol.* 16(9), 867-780.
- Alavi MV, Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, Wehrl HF, Ruttiger L, Beck SC, Tonagel F, Pichler BJ, Knipper M, Peters T, Laufs J, Wissinger B. (2007). A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 130, 1029-1042.
- Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* 26, 211-215.
- Amchenkova AA, Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP, Zorov DB. (1988). Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* 107, 481-495.
- Amiott EA, Lott P, Soto J, Kang PB, McCaffery JM, DiMauro S, Abel ED, Flanigan KM, Lawson VH, Shaw JM. (2008). Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp Neurol* 211, 115-127.
- André F, Mir LM. (2004). DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Therapy* 11, 33-42.
- Aragonés J, Schneider M, van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, Lambrechts D, Bishop T, Lafuste P, Diez-Juan A, Harten SK, Van Noten P, De Bock K, Willam C, Tjwa M, Grosfeld A, Navet R, Moons L, Vandendriessche T, Deroose C, Wijeyekoon B, Nuyts J, Jordan B, Silasi-Mansat R, Lupu F, Dewerchin M, Pugh C, Salmon P, Mortelmans L, Gallez B, Gorus F, Buyse J, Sluse F, Harris RA, Gnaiger E, Hespel P, Van Hecke P, Schuit F, Van Veldhoven P, Ratcliffe P, Baes M, Maxwell P, Carmeliet P. (2008). Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat. Genet.* 40, 170-180.
- Arnoult D, Grodet A, Lee YJ, Estaquier J, Blackstone C. (2005). Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J. Biol. Chem.* 280, 35742-35750.
- Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Dugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A. (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190-17197.

Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacin M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H, Zorzano A. (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 alpha and interleukin-6. *Diabetes* 54, 2685-2693.

Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP. (1978). Mitochondrial framework (reticulum mitochondrial) in rat diaphragm muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 501, 349-369.

Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J. (2007). Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J. Neurosci.* 27, 422-430.

Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* 120, 838-848.

Benard G, Rossignol R. (2008). Ultrastructure of the Mitochondrion and Its Bearing on Function and Bioenergetics. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 1313-1342.

Benard G, Karbowski M. (2009). Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 365-374.

Benda C. (1898). Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertrebraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. *Arch. Anat. Physiol.* 73, 393-398.

Berger P, Young P, Suter U. (2002). Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics* 4, 1-15.

Bézaire V, Seifert EL, Harper ME. (2007). Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J.* 21, 312-324.

Birch-Machin MA, Briggs HL, Saborido AA, Bindoff LA, Turnbull DM. (1994). An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 51, 35-42.

Blau HM, Pavlath GK, Hardeman EC, Chiu CP, Silberstein L, Webster SG, Miller SC, Webster C. (1985). Plasticity of the differentiated state. *Science* 230, 758-766.

Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseume E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* 118, 789-800.

Boss O, Bachman E, Vidal-Puig A, Zhang CY, Peroni O, Lowell BB. (1999). Role of the beta(3)-adrenergic receptor and/or a putative beta(4)-adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 870-876.

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127.

Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsoe R, Flemming D. (2007). Patients with Type 2 Diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50, 790-796.

- Brand MD. (1990) The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1018, 128-133.
- Brand MD. (1994). The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 132-139.
- Brand MD. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* 35, 811-820.
- Brandt U. (1997). Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1318, 79-91.
- Brooks C, Wei Q, Feng L, Dong G, Tao Y, Mei L, Xie ZJ, Dong Z. (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 11649-11654.
- Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrback K, Schoelles K. (2004). Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 292, 1724-1737.
- Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Deriaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP. (2005). Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J. Physiol.* 567, 349-358.
- Castagneto M, De Gaetano A, Mingrone G, Tacchino R, Nanni G, Capristo E, Benedetti G, Tataranni PA and Greco AV. (1994). Normalization of Insulin Sensitivity in the Obese Patient after Stable Weight Reduction with Biliopancreatic Diversion. *Obes. Surg.* 4, 161-168.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160, 189-200.
- Chen H, Chan DC. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* 14, R283-R289.
- Chen H, Chomyn A, Chan DC. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* 280, 26185-26192.
- Chen H, McCaffery JM, Chan DC. (2007). Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130, 548-562.
- Chen H, Chan DC. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 18, R169-176.
- Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141, 280-289.
- Chen KH, Guo X, Ma D, Guo Y, Li Q, Yang D, Li P, Qiu X, Wen S, Xiao RP, Tang J. (2004). Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat. Cell Biol.* 6, 872-883.
- Chicco AJ, Sparagna GC. (2007). Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C33-44.
- Chomyn A, Attardi G. (2003). MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 519-529.

Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15927-15932.

Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, De Strooper B. (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1- dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163-175.

Claypool SM, Oktay Y, Boonthueung P, Loo JA, Koehler CM. (2008). Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* 182, 937-950.

Cohen MM, Leboucher GP, Livnat-Levanon N, Glickman MH, Weissman AM. (2008). Ubiquitin-Proteasome-dependent Degradation of a Mitofusin, a Critical Regulator of Mitochondrial Fusion. *Mol Biol Cell* 19, 2457-2464.

Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT. (2001). *Current Protocols in Protein Sciences*.

Comte J, Maisterrena B, Gautheron DC. (1976). Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria comparison with microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 419, 271-284.

Conley KE, Amara CE, Jubrias SA, Marcinek DJ. (2007). Mitochondrial function, fibre types and ageing: new insights from human muscle in vivo. *Exp. Physiol.* 92, 333-339.

Cortese JD, Voglino LA, Hackenbrock CR. (1998). Novel fluorescent membrane fusion assays reveal GTP-dependent fusogenic properties of outer mitochondrial membrane-derived proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1371, 185-198.

Crettaz M, Prentki M, Zaninetti D, Jeanrenaud B. (1980). Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. *Biochem. J.* 186, 525-534.

Danko I, Williams P, Herweijer H, Zhang G, Latendresse JS, Bock I, Wolff JA. (1997). High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1435-1443.

Davies VJ, Hollins AJ, Piechota MJ, Yip W, Davies JR, White KE, Nicols PP, Boulton ME, Votruba M. (2007). Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1307-1318.

de Brito OM, Scorrano L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605-610

Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelles L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26, 207-210.

Delivani P, Adrain C, Taylor RC, Duriez PJ, Martin SJ. (2006). Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Mol Cell* 21, 761-773.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.

- Detmer SA, Chan DC. (2007). Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol* 176, 405-414.
- Diaz F, Fukui H, Garcia S, Moraes CT. (2006). Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 26, 4872-4881.
- Dietrich MO, Horvath TL. (2010). The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflugers Arch.* 459, 269-275.
- Dodou E, Xu SM, Black BL. (2003). mef2c is activated directly by myogenic basic helix-loop-helix proteins during skeletal muscle development in vivo. *Mech. Dev.* 120, 1021-1032.
- Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3225-3229.
- Dudkina NV, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP. (2006). Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends Plant Sci.* 11, 232-240.
- Dudkina NV, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP. (2008). The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 419-424.
- Dumas JF, Simard G, Flamment M, Ducluzeau PH, Ritz P. (2009). Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of insulin resistance in humans? *Diabetes Metab.* 35, 159-167.
- Duvezin-Caubet S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, Bernacchia A, Jagasia R, Rugarli EI, Imhof A, Neupert W, Langer T, Reichert AS. (2007). OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 18, 3582-3590.
- Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. (2002). Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 8, 1249-1256.
- Echtay KS, Murphy MP, Smith RA, Talbot DA, Brand MD. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J. Biol. Chem.* 277, 47129-47135.
- Ehse S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou JC, Westermann B, Rugarli EI, Langer T. (2009). Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J. Cell Biol.* 187, 1023-1036.
- Else PL, Hulbert AJ. (1987). Evolution of mammalian endothermic metabolism: "leaky" membranes as a source of heat. *Am. J. Physiol.* 253, R1-7.
- Escobar-Henriques M, Westermann B, Langer T. (2006). Regulation of mitochondrial fusion by the F-box protein Mdm30 involves proteasome-independent turnover of Fzo1. *J Cell Biol* 173, 645-650.
- Eubel H, Heinemeyer J, Braun HP. (2004). Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol.* 134, 1450-1459.

- Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K. (2003). Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 333-344.
- Faustin B, Rossignol R, Rocher C, Bénard G, Malgat M, Letellier T. (2004). Mobilization of adenine nucleotide translocators as molecular bases of the biochemical threshold effect observed in mitochondrial diseases. *J. Biol. Chem.* 279, 20411-20421.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. (1985). Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* 153, 23-26.
- Fitts RH, Booth FW, Winder WW and Holloszy JO. (1975). Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization. *Am. J. Physiol.* 228, 1029-1033.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* 1, 515-525.
- Franckhauser S, Elias I, Rotter Sopasakis V, Ferré T, Nagaev I, Andersson CX, Agudo J, Ruberte J, Bosch F, Smith U. (2008). Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia* 51, 1306-1316.
- Frezza C, Cipolat C, Scorrano L. (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.* 2, 287-295.
- Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA. (2003). The cristae membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 546, 355-358.
- Giorgi C, De Stefani D, Bononi A, Rizzuto R, Pinton P. (2009). Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1817-1827.
- Gnaiger E, Méndez G, Hand SC. (2000). High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11080-11085.
- Gnaiger E. (2007). Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. *OROBOROS MiPNet Publications*.
- Gnaiger E. (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle. New perspectives of mitochondrial physiology. *Intl. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1837-1845.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ, van der Blik AM. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 18792-18798.
- Guidone C, Manco M, Valera-Mora E, Iaconelli A, Gniuli D, Mari A, Nanni G, Castagneto M, Calvani M, Mingrone G. (2006). Mechanisms of recovery from type 2 diabetes after malabsorptive bariatric surgery. *Diabetes* 55, 2025-2031.

Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombes A, Belenguer P, Arnoult D, Rojo M. (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol. Cell* 100, 315-325.

Guillet V, Gueguen N, Verny C, Ferre M, Homedan C, Loiseau D, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Chevrollier A. (2010). Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in MFN2-related Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Neurogenetics* 11, 127-133.

Guo YH, Chen K, Gao W, Li Q, Chen L, Wang GS, Tang J. (2007). Overexpression of Mitofusin 2 inhibited oxidized low-density lipoproteina induced vascular smooth muscle cell proliferation and reduced atherosclerotic lesion formation in rabbit. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 411-417.

Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18, 331-368.

Hägerhäll C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta* 1320, 107-141.

Hales KG, Fuller MT. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121-129.

Hajek P, Chomyn A, Attardi G. (2007). Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J Biol Chem* 282, 5670-5681.

Heidt AB, Black BL. (2005). Transgenic mice that express Cre recombinase under control of a skeletal muscle-specific promoter from *mef2c*. *Genesis* 42(1), 28-32.69.

Hirst J, Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Walker JE. (2003). The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1604, 135-150.

Holloszy JO. (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 242, 2278-2282.

Holloszy JO, Oscai LB, Don IJ, Molé PA. (1970). Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: Adaptive response to exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 40, 1368-1373.

Holloszy JO, Booth FW. (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 38, 273-291.

Honda S, Aihara T, Hontani M, Okubo K, Hirose S. (2005). Mutational análisis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2. *J Cell Sci* 118, 3153-3161.

Hood DA, Pette D. (1989). Chronic long-term electrostimulation creates a unique metabolic enzyme profile in rabbit fast-twitch muscle. *FEBS Lett.* 247, 471-474.

Hood DA. (2001). Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 90, 1137-1157.

- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. (1996). IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha-and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665-668.
- Hotamisligil GS. (1999). The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J. Intern. Med.* 245, 621-625.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944-948.
- Huang P, Yu T, Yoon Y. (2007). Mitochondrial clustering induced by overexpression of the mitochondrial fusion protein Mfn2 causes mitochondrial dysfunction and cell death. *Eur J Cell Biol* 86, 289-302.
- Huang H, Frohman MA. (2009). Lipid signaling on the mitochondrial surface. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 839-844.
- Hütter E, Renner K, Pfister G, Stöckl P, Jansen-Dürr P, Gnaiger E. (2004). Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem. J.* 380, 919-928.
- Hütter E, Unterluggauer H, Garedew A, Jansen-Dürr P, Gnaiger E. (2006). High-resolution respirometry – a modern tool in aging research. *Exp. Gerontol.* 41, 103-109.
- Ishihara N, Eura Y, Mihara K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117, 6535-6546.
- Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 25, 2966-2977.
- Kaplan ML, Oh SS. (1991). Oxygen consumption of muscles from ob/ob and Ay/a strains of obese mice. *Int. J. Obes.* 15, 809-812.
- Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159, 931-938.
- Karbowski M, Jeong SY, Youle RJ. (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* 166, 1027-1039.
- Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443, 658-662.
- Kay BK, Williamson MP, Sudol M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 14, 231-241.
- Kelley DE, Mandarino LJ. (2000). Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* 49, 677-683.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 2944-2950.

- Khuchua Z , Belikova Y, Kuznetsov AV, Gellerich FN, Schild L, Neumann HW, Kunz WS. (1994). Caffeine and Ca^{2+} stimulate mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers due to activation of actomyosin ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1188, 373-379.
- Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. (2003). Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes* 52, 2784-2789.
- Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M. (2003). Dynamitin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J. Biol. Chem.* 278, 8597-8605.
- Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA, Schrader M. (2005). A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 5077-5086.
- Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, Wallace DC. (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2278-2283.
- Kom E. (1969). Cell membranes: structure and synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 38, 263-288.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. (1997). High protonic potential actuates as mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15-18.
- Koshiha T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858-862.
- Kroemer G. (2003). The mitochondrial permeability transition pore complex as a pharmacological target. An introduction. *Curr. Med. Chem.* 10, 1469-1472.
- Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481-484.
- Kunz WS, Kuznetsov AV, Schulze W, Eichhorn K, Schild L, Striggow F, Bohnensack R, Neuhof S, Grasshoff H, Neumann HW, Gellerich FN. (1993). Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 46-53.
- Kunz WS, Kudin A, Vielhaber S, Elger CE, Attardi G, Villani G. (2000). Flux control of cytochrome c oxidase in human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 275, 27741-27745.
- Kuznetsov AV, Wiedemann FR, Winkler K, Kunz WS. (1998). Use of saponin-permeabilized muscle fibers for the diagnosis of mitochondrial diseases. *Biofactors* 7, 221-223.
- Kuznetsov AV, Veksler VI, Gellerich FN, Saks VA, Margreiter R, Kunz WS. (2008). Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* 3, 965-976.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Larson-Meyer DE, Heilbronn LK, Redman LM, Newcomer BR, Frisard MI, Anton S, Smith SR, Alfonso A, Ravussin E. (2006). Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects. *Diabetes Care* 29, 1337-1344.
- Lawson VH, Graham BV, Flanigan KM. (2005). Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology* 65, 197-204.
- Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, Youle RJ, Cho H. (2007). Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J. Biol. Chem.* 282, 22977-22983.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051-4060.
- Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 15, 5001-5011.
- Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell* 13, 4343-4354.
- Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell Sci.* 117, 2653-2662.
- Lehninger AL. (1965) *The mitochondrion*. New York: W.A. Benjamin, Inc.
- Lenaz G, Genova ML. (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: Random collisions versus solid state electron channeling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C1221-C1239.
- Lenaz G, Genova ML. (2010). Structure and Organization of Mitochondrial Respiratory Complexes: A New Understanding of an Old Subject. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 961-1008.
- Lewis MR, Lewis WH. (1914). Mitochondria in tissue culture. *Science* 39, 330-333.
- Li J, Romestaing C, Han X, Li Y, Hao X, Wu Y, Sun C, Liu X, Jefferson LS, Xiong J, Lanoue KF, Chang Z, Lynch CJ, Wang H, Shi Y. (2010). Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity. *Cell Metab.* 12, 154-165.
- Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, Chanda SK, Batalov S, Joazeiro CA. (2008). Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS ONE* 3, e1487.
- Liesa M. (2008). Paper i regulació de la dinàmica mitocondrial en múscul esquelètic.
- Lin MT, Beal MF. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Liu JH, Dai Q, Chen J, Durrant D, Freeman A, Liu T, Grossman D, Lee RM. (2003). Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response. *Molecular Cancer Research* 1, 892-902.

- Ljubicic V, Joseph AM, Saleem A, Ugucioni G, Collu-Marchese M, Lai RY, Nguyen LM, Hood DA. (2010). Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 223-234.
- Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferre M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G, Amati-Bonneau P, Malthiery Y, Bonneau D, Reynier P. (2007). Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann. Neurol.* 61, 315-323.
- Lutter R, Saraste M, van Walraven HS, Runswick MJ, Finel M, Deatherage JF, Walker JE. (1993). F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem. J.* 295, 799-806.
- Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombes A, Rojo M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* 6, 853-859.
- Margulis L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 29, 21-38.
- Martel-Renoir D, Trochon-Joseph V, Galaup A, Bouquet C, Griscelli F, Opolon P, Opolon D, Connault E, Mir L, Perricaudet M. (2003). Coelectrotransfer to skeletal muscle of three plasmids coding for antiangiogenic factors and regulatory factors of the tetracycline-inducible system: tightly regulated expression, inhibition of transplanted tumor growth, and antimetastatic effect. *Mol. Ther.* 8, 425-433.
- Martin JF, Schwarz JJ, Olson EN. (1993). Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: a tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5282-5286.
- McMahon JM, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ. (2001). Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase: increased expression with reduced muscle damage. *Gene Ther.* 8, 1264-1270.
- Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747-1752.
- Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, Crapo D, Wallace DC. (1998). A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 18, 159-163.
- Mingrone G, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Naon D, Zorzano A. (2005). Could the low level of expression of the gene encoding skeletal muscle mitofusin-2 account for the metabolic inflexibility of obesity? *Diabetologia* 48, 2108-2114.
- Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 4262-4267.
- Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Movilla N, Pérez-Martos A, Rodríguez de Córdoba S, Gallardo ME, Enríquez JA. (2006). Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat. Genet.* 38, 1261-1268.

Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267-273.

Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M, Honda S, Hirose S. (2006). MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep* 7, 1019-1022.

Naon D. (2009). Identificación y propiedades funcionales de variantes de splicing de mitofusina 2.

Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, McBride H. (2005). Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem* 280, 25060-25070.

Nunnari J, Marshall WF, Straight A, Murray A, Sedat JW, Walter P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell* 8, 1233-1242.

Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743-7746.

Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 191, 1141-1158.

Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. (2004). Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ. Res.* 94, 53-59.

Paz JC. (2008). Papel de la proteína mitocondrial Mitofusina 2 en el metabolismo hepático.

Pecina P, Gnaiger E, Zeman J, Pronicka E, Houštěk J. (2004). Decreased affinity to oxygen of cytochrome c oxidase in Leigh syndrome caused by SURF1 mutations. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C1384-C1388.

Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F. (2005). GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1087-1094.

Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vanzulli A, Testolin G, Pozza G, Del Maschio A, Luzi L. (1999). Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 48, 1600-1606.

Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. (2003). Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300, 1140-1142.

- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 350, 664-671.
- Pich S. (2004). Paper de mitofusina-2 en el manteniment i el metabolisme de la xarxa mitocondrial.
- Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A. (2005). The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, upregulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1405-1415.
- Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. (2003). Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 546, 851-858.
- Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27, 6407-6418.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.
- Renner K, Amberger A, Konwalinka G, Gnaiger E. (2003). Changes of mitochondrial respiration, mitochondrial content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1642, 115-123.
- Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, Ricard N, Jacquet D, Bastard JP, Laville M, Vidal H. (2004). Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53, 2232-2241.
- Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, Lazzaro D, Costa P, Mathiesen I, Cortese R, Ciliberto G, Laufer R, La Monica N, Fattori E. (1999). Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6417-6422.
- Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* 115, 1663-1674.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228, 35-51.
- Rutter GA, Rizzuto R. (2000). Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection. *Trends Biochem. Sci.*, 25, 215-221.
- Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, Tranqui L, Olivares J, Winkler K, Wiedemann FR, Kunz WS. (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function *in vivo*. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 81-100.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press USA*.
- Santel A, Fuller MT. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114, 867-874.

Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116, 2763-2774.

Santel A, Frank S. (2008). Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* 60, 448-455.

Saraste M. (1999). Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283, 1488-1493.

Schägger H, von Jagow G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223-231.

Schägger H. (1995). Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods Enzymol.* 260, 190-202.

Schägger H, Pfeiffer K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777-1783.

Schägger H. (2001). Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol.* 65, 231-244.

Schägger H, Pfeiffer K. (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes i-v in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 276, 37861-37867.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 54, 823-827.

Schapira AH. (2007). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* 14, 1261-1266.

Scorrano L. (2009). Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1875-1883.

Skovbro M, Boushel R, Hansen CN, Helge JW, Dela F. (2011). High fat feeding inhibits exercise induced increase in mitochondrial respiratory flux in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* [Epub ahead of print].

Skre H. (1974). Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* 6, 98-118.

Skulachev VP. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* 26, 23-29.

Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Blik AM. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* 143, 351-358.

Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM. (2001). Dynamin related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12, 2245-2256.

Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential and Yme1L. *J. Cell Biol.* 178, 749-755.

Soriano FX. (2004). Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético.

- Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacin M, Zorzano A. (2006). Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes* 55, 1783-1791.
- Speakman JR, Talbot DA, Selman C, Snart S, McLaren JS, Redman P, Krol E, Jackson DM, Johnson MS, Brand MD. (2004). Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell* 3, 87-95.
- Stadlmann S, Rieger G, Amberger A, Kuznetsov AV, Margreiter R, Gnaiger E. (2002). H₂O₂-mediated oxidative stress versus cold ischemia-reperfusion: mitochondrial respiratory defects in cultured human endothelial cells. *Transplantation* 74, 1800-1803.
- Stevens BJ. (1977). Variation in number and volume of mitochondria in yeast according to growth-conditions - Study based on serial sectioning and computer graphics reconstitution. *Biologie Cellulaire* 28, 37-56.
- Stone SJ, Vance JE. (2000). Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J. Biol. Chem.* 275, 34534-34540.
- Storlien L, Oakes ND, Kelley DE. (2004). Metabolic flexibility. *Proc. Nutr. Soc.* 63, 363-368.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784-44790.
- Thomas DY, Wilkie D. (1968). Recombination of mitochondrial drug-resistance factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 30, 368-372.
- Toledo FG, Watkins S, Kelley DE. (2006). Changes induced by physical activity and weight loss in the morphology of intermyofibrillar mitochondria in obese men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 3224-3227.
- Tondera D, Czauderna F, Paulick K, Schwarzer R, Kaufmann J, Santel A. (2005). The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 118, 3049-3059.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136-1144.
- Turcotte LP, Swenberger JR, Zavitz TM, Yee AJ. (2001). Increased fatty acid uptake and altered fatty acid metabolism in insulin-resistant muscle of obese Zucker rats. *Diabetes* 50, 1389-1396.
- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27, 433-446.
- Vance JE. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 7248-7256.

Verhoeven K, Claeys KG, Zuchner S, Schroder JM, Weis J, Ceuterick C, Jordanova A, Nelis E, De Vriendt E, Van Hul M, Seeman P, Mazanec R, Saifi GM, Szigeti K, Mancias P, Butler IJ, Kochanski A, Ryniewicz B, De Bleecker J, Van den BP, Verellen C, Van Coster R, Goemans N, Auer-Grumbach M, Robberecht W, Milic R, V, Nevo Y, Tournev I, Guerguelcheva V, Roelens F, Vieregge P, Vinci P, Moreno MT, Christen HJ, Shy ME, Lupski JR, Vance JM, De Jonghe P, Timmerman V. (2006). MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 129, 2093-2102.

Vettor R, Mingrone G, Manco M, Granzotto M, Milan G, Scarda A, Lombardi A, Greco AV, Federspil G. (2003). Reduced expression of uncoupling proteins-2 and -3 in adipose tissue in post-obese patients submitted to biliopancreatic diversion. *Eur. J. Endocrinol.* 148, 543-550.

Vonck J, Schäfer E. (2009). Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 117-124.

Wakabayashi T, Green DE. (1977). Membrane fusion in mitochondria. I. Ultrastructural basis for fusion. *J Electron Microsc (Tokyo)* 26, 305-320.

Wang DZ, Valdez MR, McAnally J, Richardson J, Olson EN. (2001). The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. *Development* 128, 4623-4633.

Wang W, Zhu F, Wang S, Wei J, Jia C, Zhang Y, Zhou L, Xie H, Zheng S. (2010). HSG provides antitumor efficacy on hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* 24, 183-188.

Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X. (2008). Dynamin-Like Protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am. J. Pathol.* 173, 470-482.

Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV. (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* 356, 1736-1741.

Wells DJ, Goldspink G. (1992). Age and sex influence expression of plasmid DNA directly injected into mouse skeletal muscle. *FEBS Lett.* 306, 203-205.

Winkler K, Kirches E, Mawrin C, Dietzmann K, Lins H, Wallesch CW, Kunz WS, Wiedemann FR. (2005). Re-evaluation of the dysfunction of mitochondrial respiratory chain in skeletal muscle of patients with Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 112, 499-518.

Wittig I, Schägger H. (2009). Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 672-680.

Wong ED, Wagner JA, Gorsich SW, McCaffery JM, Shaw JM, Nunnari J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* 151, 341-352.

Wu L, Li Z, Zhang Y, Zhang P, Zhu X, Huang J, Ma T, Lu T, Song Q, Li Q, Guo Y, Tang J, Ma D, Chen KH, Qiu X. (2008). Adenovirus-expressed human hyperplasia suppressor gene induces apoptosis in cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 222-232.

Yaffe D, Saxel O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270, 725-727.

Yaffe MP. (1999). The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 283, 1493-1497.

Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol. Cell Biol.* 23, 5409-5420.

Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, Wissinger B, Pinti M, Cossarizza A, Vidoni S, Valentino ML, Rugolo M, Carelli V. (2008). OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 131, 352-367.

Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, De Jonghe P, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battologlu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature Genetics* 36, 449-451.

Zuchner S, De Jonghe P, Jordanova A, Claeys KG, Guergueltcheva V, Cherninkova S, Hamilton SR, Van Stavern G, Krajewski KM, Stajich J, Tournev I, Verhoeven K, Langerhorst CT, de Visser M, Baas F, Bird T, Timmerman V, Shy M, Vance JM. (2006). Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann. Neurol.* 59, 276-281.

