



**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona**

# **REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DE MITOFUSINA 2 EN MÚSCULO ESQUELÉTICO**

**FRANCESC X. SORIANO ZARAGOZA  
TESIS DOCTORAL  
Barcelona, 2004**



**MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE  
DOCTOR EN BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA, BIENNI 2001-2002, DEL  
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR DE LA  
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**Presentada per:**

**FRANCESC X. SORIANO ZARAGOZA**

Vist i plau del director:

L'interessat,

Prof. Dr. Antonio Zorzano Olarte  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Universitat de Barcelona

Francesc X. Soriano Zaragoza





## AGRAÏMENTS.

En el camp de les ciències biomèdiques, és impossible realitzar una tesi sense l'ajuda de moltíssima gent. No m'agradaria que tots aquells que han contribuït en la realització d'esta tesi, necessitaren llegir estes línies per saber que els ho estic molt agraït. Tot i l'imperdonable risc de deixar-me a algú us anomenaré per a què mai s'oblidi.

L'Antonio és la persona a qui li estic més agraït. Des del primer contacte que vaig tindre amb ell per correu electrònic sempre ha demostrat ser una excel·lent persona tant a nivell professional com personal. Recorde els meus pèssims inicis, quan no havia manera de clonar el promotor de *Mfn2*, o *MARF* com ho coneixíem aleshores, i per a més *INRI* no m'eixien uns *northern*s necessaris per enviar un article a publicar. D'haver tingut a altre com a director potser hauria acabat al carrer, però l'actitut de l'Antonio va ser aconsellar-me i animar-me, aleshores i sempre. És increïble la seua capacitat de motivació, quantes vegades no he entrat al seu despatx amb uns resultats desastrosos i he eixit feliç com si haguera trobat el secret de la vida. Sempre ha fomentat la creativitat i m'ha animat a seguir el meu instint. Gràcies Antonio.

El Manuel com a *co-jefe* del grup tinc molt que agrair-li i sobretot molt que aprendre d'ell.

Li agraisc al Diego Haro l'atenció que m'ha prestat sempre i especialment per la vesprada que em va dedicar a discutir a què podia estar coactivant PGC-1.

Agraisc a tots els membres del programa *Nature* de la Universitat de Barcelona per concedir-me la beca que em va portar a ací, i en especial al Pedro Marrero, que ens va dedicar molt de temps i ens va ajudar en tot el que va poder i més. Al *Instituto Danone* per finançar-me durant dos anys.

A tots aquells que amablement m'han cedit reactius. Als laboratoris de TAM de Biologia i Sucres del Parc, que providencialment sempre han tingut eixe reactiu quan més l'he necessitat.

Als *mitofuseros*, amb qui he treballat colze amb colze i puc assegurar que ha sigut un autèntic plaer. El Dani, de qui he après molt. La Sara, la nostra nova *leader*. Les noves incorporacions (algunes no tan noves), la Deborah, el Marc Liesa, la Jessica i el José Carlos.

A l'Horacio, que ha sigut el meu primer mestre en el grup.

Al Luc, la Marta Camps i la Sílvia, que junt amb la Sara m'han ajudat en els experiments amb animals.

Al Joan Bertran. Tindre en un laboratori una persona amb tants coneixements de biologia molecular com ell és una garantia.

A la resta de post-docs actuals. El Josep, el Raúl, la Manu, l'Eleonora, l'Anna Gumà i la Perla. En més d'una ocasió m'han sabut solucionar els problemes.

Al Hans i el Jordi, que entre altres coses, m'han solucionat els problemes informàtics.

A aquells que m'han convidat a acabar la setmana com marquen les normes i les bones costums. Els fundadors: la Lorena, l'Emma i el Dani. El relleu: el Carles, la Nuri, el Jose i la Cristina.

A la resta d'insulinos, passats i presents, sempre disponibles a l'hora d'ajudar i què podria donar exemples concrets de perquè els ho estic agraït, però el motiu principal ha sigut crear eixe ambient tan agradable i fer que el dia a dia fos més fàcil inclús en els moments més difícils. L'Anna Ros, la Marta Pineda, , l'Espe, la Maite, la Paola, la Joana, l'Helena, l'Alfons, el Marc Yeste, les Meris (Gran i Petita), l'Óscar, la Laura, el Reini, la Marta

Carrasco, la Susanna, el Cesar, la Mercè, les portugueses (Andreia i Sonia), l'Anna Abella, la Judit Canicio, la Marta Carrasco, l'Ana-Vi, la Sofia, el Benhardt i l'Eli. A tots vosaltres, moltes gràcies.

Dos grups de persones són fonamentals pel funcionament del laboratori. Les tècnics presents o que han passat pel grup durant estos quatre anys: Míriam, Rut, Sussanna, Noemí, Judith i Ana Pérez i encara que incorporada recentment, aprofite per desitjar-li sort a l'Eli. I els *buròcrates*: el David Verde, la Judith i Maite. Gràcies per lluitar contra l'entropia.

Estic en deute amb el Dr. Clausen, que va ser el primer en obrir-me la porta de la ciència, i el Dr. Forloni. Tots dos han contribuït en la meua formació científica i per tant, d'alguna manera, en la realització d'esta tesi.

No puc oblidar-me de la meua família. Sempre he tingut el suport dels meus pares i germans en les meues decisions. El gran respecte cap als científics i l'amor pel coneixement que té mon *tio* Joaquín han sigut una motivació per a mi.

I l'última de la llista, però no en importància. L'Ofelia, que des del punt de vista científic m'ha proporcionat reactius, consells, idees, ... però més important que tot això és la convivència i l'estabilitat que em dona. Gràcies Ofelia, t'ho dic amb el cor.



<b>Índice.</b>	1
<b>Introducción.</b>	9
<b>Papel funcional de la proteína mitocondrial Mitofusina.</b>	11
<b>Regulación transcripcional de la biogénesis mitocondrial.</b>	18
Transcripción de genes mitocondriales.	19
Transcripción de proteínas mitocondriales codificadas por el genoma mitocondrial.	20
Señalización en el control de la biogénesis mitocondrial.	30
<b>Materiales y Métodos.</b>	33
<b>1 Modelos animales y toma de muestras.</b>	35
<b>2 Cultivos celulares.</b>	36
<b>3 Técnicas generales de manipulación del DNA.</b>	43
<b>4 Amplificación <i>First Choice</i><sup>TM</sup> <i>RACE-Ready</i> cDNA.</b>	50
<b>5 Transfección celular transitoria.</b>	51
<b>6 Análisis de la actividad transcripcional.</b>	55
<b>7 Infección con adenovirus.</b>	58
<b>8 Obtención de mitocondrias y proteínas mitocondriales.</b>	61
<b>9 Obtención de extractos nucleares.</b>	67
<b>10 Retardo en gel.</b>	72
<b>11 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).</b>	81
<b>12 Valoración de proteínas.</b>	87
<b>13 <i>Western blot</i>.</b>	88
<b>14 <i>Northern blot</i>.</b>	93
<b>15 Medida de cambios en el potencial de membrana mitocondrial (<math>\Delta\Psi</math>).</b>	99

<b>Objetivos.</b>	101
<b>Resultados.</b>	105
1. Caracterización del promotor de <i>Mfn2</i> .	107
2. <i>Mfn2</i> media el efecto estimulador de PGC-1 $\alpha$ sobre la actividad mitocondrial.	127
3. Papel de MEF2 en la regulación de <i>Mfn2</i> en fibras musculares oxidativas y glucolíticas.	147
<b>Discusión.</b>	163
1. Caracterización del promotor de <i>Mfn2</i> .	165
2. <i>Mfn2</i> media el efecto estimulador de PGC-1 $\alpha$ sobre la actividad mitocondrial.	170
3. Papel de MEF2 en la regulación de <i>Mfn2</i> en fibras musculares oxidativas y glucolíticas.	175
<b>Conclusiones.</b>	181
<b>Bibliografía.</b>	185
<b>Apéndice.</b>	203
<b>Abreviaturas.</b>	211

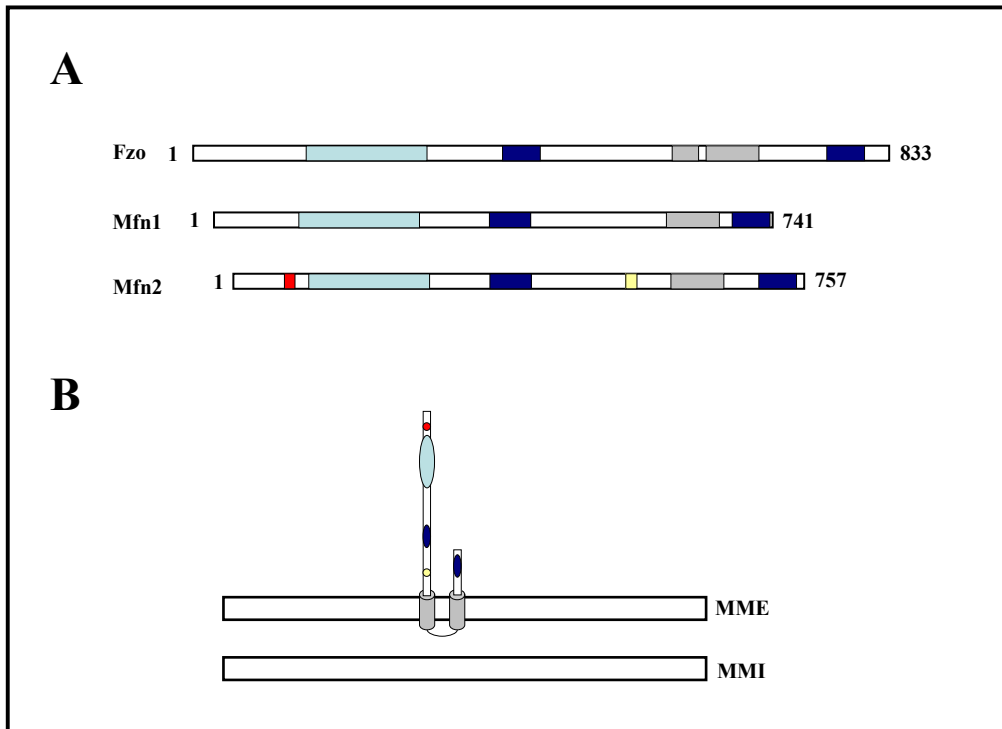
## **Regulación transcripcional del gen de Mitofusina 2 en músculo esquelético**

## **Papel funcional de la proteína mitocondrial Mitofusina.**

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que cambian de número y morfología dependiendo del tipo celular y de las condiciones ambientales en una misma célula (Bereiter-Hahn y Voth, 1994; Griparic y van der Bliek, 2001) . Los cambios en la morfología mitocondrial se producen mediante procesos de fusión y fisión mitocondrial (Karbowski y Youle, 2003; Mozdy y Shaw, 2003). La primera proteína de fusión mitocondrial identificada fue la proteína de *Drosophila melanogaster* Fzo (Hales y Fuller, 1997). En mamíferos existen dos homólogos de Fzo denominados Mitofusina 1 y 2 (Santel y Fuller, 2001).

### **Estructura proteica de la Mitofusina (Mfn).**

Las Mfn1 y 2 humanas poseen 741 y 757 aminoácidos respectivamente y Fzo de *Drosophila* 833 aminoácidos (Fig. 1). Fzo tiene una identidad del 32% con Mfn1 y con Mfn2 de un 33%. La identidad entre las dos mitofusinas humanas es de un 60% mientras que su homología es de un 77% (Santel y Fuller, 2001). La región con mayor homología entre Mfn1 y 2 está en el dominio GTPasa situado en el extremo N-terminal. Mfn2 posee entre los aminoácidos 576-590 un motivo rico en prolinas que se halla pobremente conservado en Mfn1 y Fzo. Dominios ricos en prolinas con la repetición PXX están involucrados en interacciones proteína-proteína (Kay et al., 2000). En la región C-terminal se halla un segmento hidrofóbico que forma el dominio transmembrana. A ambos lados del dominio transmembrana se encuentran dos regiones *coiled-coil*. Los motivos *coiled-coil* son regiones con estructura de helices- $\alpha$  con una periodicidad de siete aminoácidos designados de la a-g. Los aminoácidos a y d son residuos hidrofóbicos. Estos residuos hidrofóbicos se orientan en la misma cara de la hélice de modo que pueden interactuar hidrofóticamente con otra hélice para estabilizar una interacción proteína-proteína.



**Figura 1. Estructura y topología de la Mfn.** A.- La familia de la Mfn comprende un grupo de proteínas GTPasas con gran homología en el extremo N-terminal donde se encuentra el dominio GTPasa (azul claro). En el extremo C-terminal se encuentra un dominio transmembrana (gris) partido por un pequeño *loop*, más evidente en Fzo de *D. Melanogaster*. A ambos lados del dominio transmembrana se hallan dos dominios *coiled-coil* (azul oscuro). Mfn2 posee dos dominios que no se hallan conservados en las otras Mfn. En el extremo N-terminal, un dominio de unión a Ras (rojo) y entre el *coiled-coil* 1 y el dominio transmembrana una zona rica en prolinas (amarillo) que podría estar involucrado en interacciones con proteínas. B.- Mfn localiza en la membrana mitocondrial externa (MME), con la parte N- y C-terminal orientada hacia el citosol. El dominio transmembrana atraviesa dos veces a la membrana mitocondrial externa quedando un pequeño *loop* orientado en el espacio intermembrana.

### Papel de la Mfn en la fusión mitocondrial.

En las células eucariotas la morfología mitocondrial se mantiene por un equilibrio entre los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Los procesos de fisión dependen de GTPasas de la familia de las dinaminas (Shaw y Nunnari, 2002). Como se ha comentado, los procesos de fusión dependen de las mitofusinas. Tanto Mfn1 como Mfn2 son necesarias en la fusión mitocondrial. Ratones deficientes en Mfn1 o en Mfn2 mueren durante la gestación, pero en

días embrionarios distintos y mostrando diferente fragmentación mitocondrial (Chen et al., 2003). La sobreexpresión de Mfn1 en células deficientes de Mfn2 rescatan parcialmente la morfología mitocondrial y viceversa (Chen et al., 2003). Durante la fusión mitocondrial es necesaria la interacción de Mfn presentes en mitocondrias adyacentes, formando complejos homo y heterotípicos (Chen et al., 2003; Koshiba et al., 2004). En un primer paso hay un acercamiento entre mitocondrias mediado por el dominio *coiled-coil* 2 de las Mfn, formando un complejo dimérico antiparalelo mediante interacciones hidrofóbicas (Koshiba et al., 2004). En un segundo paso se debe producir una distorsión, posiblemente mediada por la hidrólisis de GTP, para a continuación fusionarse las membranas externas de la mitocondria. Estudios de fusión mitocondrial *in vitro* utilizando mitocondrias de levadura indican que el proceso de fusión mitocondrial tiene dos fases, una primera fase en la que se fusionan las membranas mitocondriales externas y una segunda fase en la que se fusionan las membranas mitocondriales internas. En ambas fases el papel de la actividad GTPasa es fundamental para completar la fusión mitocondrial pues mutaciones en el dominio GTPasa inhiben la fusión *in vivo* y los ensayos *in vitro* de fusión mitocondrial indican que la hidrólisis del GTP es esencial para la fusión (Rojo et al., 2002; Santel and Fuller, 2001; Santel et al., 2003). Además de la actividad GTPasa, es necesaria la existencia de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) para la fusión tanto de la membrana mitocondrial externa como la interna (Legros et al., 2002; Meeusen et al., 2004).

Tanto Fzo como sus homólogos de mamífero, Mfn1 y Mfn2, se hallan en la membrana mitocondrial externa, atravesándola dos veces y exponiendo los extremos N- y C-terminales hacia el citoplasma, dejando un pequeño *loop* en el espacio intermembrana (Fig. 1; Mozdy y Shaw, 2003). Se ha sugerido la existencia de una interacción directa o indirecta entre las Mfn y la membrana mitocondrial interna para coordinar su fusión dado que mutantes de Fzo muestran comprometida la fusión de la membrana mitocondrial interna *in vitro* (Meeusen et al., 2004). El *loop* orientado hacia el espacio intermembrana es posiblemente el dominio que interacciona con la membrana mitocondrial interna. La interrupción del *loop* intermembrana de Fzo inhibe la fusión mitocondrial (Fritz et al., 2001). Mgm1 es una GTPasa localizada en el espacio intermembrana en levaduras cuya mutación provoca fragmentación mitocondrial (Wong et al., 2000). Se ha demostrado la interacción de Fzo con Mgm1 y con Ugo1, otra proteína mitocondrial localizada en la

## Introducción

membrana mitocondrial externa y cuyos mutantes se caracterizan por presentar fragmentación mitocondrial (Sesaki y Jensen, 2001). Ensayos de co-inmunoprecipitación muestran que la asociación Fzo-Mgm1-Ugo1 parece ser transitoria, esto sugiere que estas proteínas sólo se asocian en los complejos de fusión activos para disociarse después de la fusión (Sesaki y Jensen, 2004). Ugo1 no parece estar conservada en mamíferos, pero Mgm1 tiene un homólogo humano denominado OPA-1 (Olichon et al., 2002). Esta proteína se ha localizado en la membrana mitocondrial interna (Olichon et al., 2002) aunque en otro trabajo se ha localizado también en el espacio intermembrana y en la membrana mitocondrial externa (Satoh et al., 2003). El hecho de que en levaduras interaccionen Fzo-Mgm1-Ugo1 hace plantearse si en mamíferos pueda existir la interacción, directa o mediada por una proteína aún por descubrir, Mfn-Opa1 durante el proceso de fusión mitocondrial. La existencia de este tipo de interacciones ayudará a entender el mecanismo por el cual las proteínas Fzo (Mfn) participan en la fusión de la membrana mitocondrial interna.

## **Papel de la Mfn en el metabolismo mitocondrial.**

Existen diversas evidencias que demuestran que el comportamiento dinámico de las mitocondrias es crucial en determinadas funciones celulares como la herencia del mtDNA (Hermann et al., 1998; Rapaport et al., 1998), el envejecimiento celular (Nakada et al., 2001), la transmisión de señales de  $Ca^{2+}$  (Skulachev, 2001; Szabadkai et al., 2004) y en procesos de desarrollo celular como la espermatogénesis en *Drosophila* (Hales y Fuller, 1997).

El grupo de Skulachev en Moscú fue pionero en proponer un papel de la red mitocondrial en el metabolismo (Amchenkova et al., 1988). En sus estudios Skulachev demostró que las mitocondrias están conectadas formando una unidad eléctrica que comparte el mismo potencial de membrana mitocondrial. Estas observaciones, junto con el hecho de que las redes mitocondriales más extensas se hallen en células con elevado gasto energético como las musculares, llevó a Skulachev a proponer la denominada teoría de los cables transmisores de energía (Skulachev, 2001) en la que se propone que una red mitocondrial extensa es eficiente en condiciones en las que la disponibilidad de oxígeno en la región

central es limitante para mantener la actividad de la cadena respiratoria. En estas condiciones, el funcionamiento mitocondrial podría ser de tal manera que las mitocondrias localizadas cerca de la membrana citoplasmática consumiesen el oxígeno aportado por los capilares y el gradiente de protones generado por la cadena respiratoria se transmitiría a las mitocondrias perinucleares donde tendría lugar la síntesis del ATP.

Existen diversas evidencias del papel de las Mfn en el mantenimiento del metabolismo mitocondrial, especialmente Mfn2. La función de la actividad respiratoria de células deficientes en Mfn1 o Mfn2 está altamente comprometida como se demostró con la tinción con el colorante sensible al  $\Delta\Psi$ , *MitoTrackerRed*. Células deficientes de Mfn1 muestran una tinción débil y en el mismo tratamiento con células mutantes de Mfn2 no se evidenció tinción (Chen et al., 2003). Otro dato que sugiere un papel metabólico de Mfn2 y de Mfn1 proviene de estudios del K.O. de ambos genes. Tanto el K.O. de Mfn1 como el de Mfn2 son letales a partir del día embrionario 10,5 cuando se produce la maduración de la ultraestructura mitocondrial cardíaca y aumenta la dependencia de la OXPHOS para la producción de energía (Bushdid et al., 2003). Además, la placenta del K.O. de Mfn2 muestra defectos en las células del trofoblasto, que se caracterizan por ser células poliploides con una gran actividad metabólica, fenotipo que no se observa en el K.O. de Mfn1 (Chen et al., 2003).

En nuestro laboratorio se ha investigado el papel de Mfn2 en la regulación del metabolismo mitocondrial. Hemos demostrado que la expresión génica de *Mfn2* se reprime en músculo esquelético de ratas obesas e individuos obesos y existe una reducción de la red mitocondrial en el músculo esquelético de ratas obesas (Bach et al., 2003). La represión de Mfn2 en células musculares disminuye la oxidación de glucosa, ácidos grasos, el  $\Delta\Psi$ , aumenta la captación de glucosa y la actividad glucolítica (Bach et al., 2003; Pich, 2004). Todos estos cambios no se asocian a disminuciones en la masa mitocondrial y el mtDNA, pero sí a una disminución en la cantidad de proteína y actividad de los complejos I, II, III y V (Pich, 2004). Por otra parte, la sobreexpresión de Mfn2 produce aumento de la oxidación de glucosa y el  $\Delta\Psi$  de modo independiente a la actividad GTPasa y al dominio transmembrana (Pich, 2004). Las células que sobreexpresan Mfn2 muestran una mayor expresión proteica del complejo I y IV (Pich, 2004). En cuanto a los posibles mecanismos por los que Mfn2 modifica la actividad mitocondrial datos de la Dra. Pich han demostrado



## Introducción

la coimmunoprecipitación de Mfn2 con los complejos I y II de la cadena de transporte electrónico.

## Papel de Mfn en la apoptosis.

El papel de la mitocondria en la apoptosis se ha relacionado con la pérdida del  $\Delta\Psi$ , que se considera un punto de no retorno en el proceso apoptótico (Zamzami et al., 1995). En el proceso apoptótico se libera el citocromo c y otras proteínas mitocondriales como Smac/Diablo que activan las caspasas (Wang, 2001). Durante estadios tempranos de la apoptosis se fragmenta la mitocondria (Wang, 2001). La proteína proapoptótica de la familia de Bcl2, Bax es esencial en la vía mitocondrial de la apoptosis (Wei et al., 2001). Bax es citosólica en células sanas, pero la iniciación del proceso apoptótico provoca su localización en puntos de la mitocondria junto con el también miembro de la familia de Bcl2, Bak (Hsu et al., 1997; Nechushtan et al., 2001). Se ha propuesto que el mecanismo por el que Bax induce la apoptosis es mediante la interacción de Bax con los componentes del poro de transición de la permeabilización (Desagher y Martinou, 2000). Basándose en estudios con membranas artificiales, se ha propuesto otro modelo en el que Bax, directamente, forma poros que permiten la liberación de proteínas mitocondriales al citosol para iniciar la apoptosis (Antonsson et al., 1997; Schlesinger et al., 1997; Basanez et al., 1999). Estudios recientes han relacionado la maquinaria de fusión/fisión en la regulación de la apoptosis. La proteína de fisión mitocondrial Drp1 y la de fusión Mfn2 colocalizan con la proteína proapoptótica Bax en determinados puntos de la mitocondria, pero no lo hacen otras proteínas implicadas en la morfología mitocondrial (Karbowski et al., 2002). La sobreexpresión Drp1 o Mfn2 *per se* no provocan apoptosis a pesar de modificar la estructura mitocondrial, pero sensibilizan a las células a estímulos apoptóticos (Sugioka et al., 2004; Szabadkai et al., 2004b; Pich, 2004). Un estudio reciente de Sugioka et al. demuestra que la sobreexpresión de Mfn1 y Mfn2 inhiben la liberación del citocromo c y la activación de Bax/Bak estimulada por el inhibidor de la topoisomerasa II, etoposide, mientras que su represión por siRNA provoca una mayor sensibilización a la apoptosis. En este mismo estudio se muestra que la represión de Drp1 bloquea el efecto apoptótico del

mismo estímulo. Este estudio no es el primero que asocia Drp1 con una mayor sensibilización a la apoptosis (Breckenridge et al., 2003; Frank et al., 2001), pero recientemente se ha demostrado el papel de Drp1 como proteína protectora contra la apoptosis mediada por el exceso de captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (Szabadkai et al., 2004a). Ciertos estímulos como la ceramida  $\text{C}_2$ , el ácido araquidónico o el  $\text{H}_2\text{O}_2$  inducen el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico a la mitocondria, provocando un gran incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  lo que lleva a permeabilización de la membrana mitocondrial y activación de caspasas (Bernardi, 1999). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce en puntos de la mitocondria yuxtapuestos al retículo endoplasmático y se propaga a través de la red mitocondrial. En este sentido, la fragmentación de la red protege de la difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo de toda la red mitocondrial. El papel de Mfn en la apoptosis mediada por el exceso de captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  no ha sido determinado.

Por último, es de interés destacar que Mfn2 se expresa abundantemente en el cerebro (Bach et al., 2003) y en muchas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson se ha demostrado muerte neuronal por apoptosis (Vila y Przedborski, 2003). El papel de Mfn2 en el desarrollo de estas enfermedades debería ser objeto de estudio. De hecho, recientemente se ha relacionado mutaciones en el gen de Mfn2 con la neuropatía de tipo 2 de Charcot-Marie-Tooth (Zuchner et al., 2004).

### **Papel de Mfn en la proliferación celular.**

Los primeros estudios que sugieren un papel de la mitofusina en la proliferación celular provienen de estudios de expresión diferencial en células de cáncer de pulmón. Se observó que Mfn1, así como una forma corta generada por *splicing* alternativo, se hallaba sobreexpresada en las células tumorales (Chung et al., 2001). El significado fisiológico de esta observación o si es causa o consecuencia del proceso tumoral se desconoce, pero su sorprendente localización en la membrana citoplasmática con el extremo N-terminal dirigido hacia el exterior celular permite hipotetizar a los autores de un posible papel de Mfn1 como receptor que media en las vías de transducción de señales (Chung et al., 2001).

## **Introducción**

Recientemente se ha descrito a Mfn2 como una proteína antiproliferativa, implicada en desordenes vasculares (Chen et al., 2004). La acción antiproliferativa de Mfn2 es independiente de su localización mitocondrial, al contrario, la delección del dominio transmembrana potencia el efecto antiproliferativo. El mecanismo por el que Mfn2 inhibe la proliferación es por interacción con Ras e inhibición de la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK1/2. La interacción con Ras se produce en el motivo p21<sup>ras</sup> que existe entre los aminoácidos 77-92 de Mfn2. Esta secuencia se conserva entre especies, pero no se encuentra ni en Mfn1 ni en Fzo, por lo que se puede suponer que esta función antiproliferativa está limitada a Mfn2. La delección del motivo p21<sup>ras</sup> de Mfn2 bloquea el efecto antiproliferativo.

## **Regulación transcripcional de la biogénesis mitocondrial.**

La mitocondria ha sido ampliamente estudiada por su papel en la generación de ATP a partir de substratos metabólicos a través de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Desde el punto de vista de la biogénesis la mitocondria, ésta necesita la contribución de dos genomas físicamente separados. Las mitocondrias poseen su propio genoma que en mamíferos codifica para 37 genes (Garesse y Vallejo, 2001). El genoma mitocondrial codifica componentes de la maquinaria de traducción y 13 genes que codifican proteínas del sistema OXPHOS. El genoma nuclear se encarga de codificar el resto de las subunidades del sistema OXPHOS así como factores implicados en el metabolismo del DNA mitocondrial (mtDNA) y otras proteínas mitocondriales. La biogénesis mitocondrial requiere, por tanto, de la cooperación del genoma mitocondrial y del nuclear.

## Transcripción de genes mitocondriales.

El mtDNA se hereda exclusivamente por parte materna y se caracteriza por la existencia de pocos espacios intergénicos, carencia de intrones y un código genético que difiere ligeramente del código universal (Clayton, 2000).

El genoma mitocondrial está formado por una molécula circular de DNA de doble cadena de aproximadamente 16,5 kb en los vertebrados, y que permite la síntesis de 24 componentes de la maquinaria de traducción mitocondrial: 22 tRNAs y 2 rRNAs (12S y 16S) así como proteínas componentes del sistema OXPHOS: 7 subunidades del complejo I (ND1 a 6 y ND4L), una subunidad del complejo III (Cyt b), 3 subunidades del complejo IV (COX-I a III) y 2 subunidades del complejo V (ATPasa 6 y 8) (Garesse y Vallejo, 2001).

Los elementos en *cis* responsables de estos procesos se hallan principalmente localizados en una pequeña región del DNA no codificante, la región *D-loop*. Los elementos en *trans* implicados en el metabolismo del mtDNA son codificados por el genoma nuclear. La transcripción y replicación del mtDNA se realizan en la mitocondria. La cadena pesada (H) y la ligera (L) se replican asincrónicamente y asimétricamente. La síntesis del DNA de la cadena pesada empieza en el origen de replicación  $O_H$  situado en el *D-loop*, la de la cadena ligera en el origen de replicación  $O_L$  situado a 2/3 más allá en el genoma (Garesse y Vallejo, 2001).

En mamíferos la transcripción se inicia en tres promotores PH1, PH2 y PL en el *D-Loop* (Garesse y Vallejo, 2001). En la replicación del mtDNA el transcrito de RNA iniciado en el PL es cortado en una zona de tres secuencias altamente conservadas (CSB I, II y III), y la replicación de la cadena H se inicia en los sitios de corte (Bogenhagen y Clayton, 2003). Así la transcripción está acoplada a la replicación del mtDNA. Los niveles de transcritos mitocondriales correlaciona generalmente con variaciones en el mtDNA (Heddi et al., 1993; Puntschart et al., 1995; Williams, 1986). Los transcritos mitocondriales son poligénicos. La transcripción del mtDNA requiere una mtRNA polimerasa (Tiranti et al., 1997) la cual necesita de factores de transcripción para poder reconocer el promotor mitocondrial e iniciar la transcripción (Fisher y Clayton, 1985).

El factor de transcripción Tfam fue el primero en purificarse (Fisher y Clayton, 1985). Existen lugares de unión en el PH1 y PL aunque posee mayor afinidad y capacidad de

## Introducción

activar la transcripción desde el PL (Fisher et al., 1987). Además de la unión específica al promotor, Tfam se une inespecíficamente a otras secuencias del mtDNA lo que sugiere que juega un papel en el mantenimiento y estabilización del cromosoma mitocondrial (Parisi et al., 1993). Los niveles de Tfam correlacionan con la abundancia del mtDNA (Larsson et al., 1994; Poulton et al., 1994). El K.O. de Tfam sufre letalidad embrional y depleción del mtDNA (Larsson et al., 1998). Recientemente se ha clonado un factor de transcripción mitocondrial B humano (McCulloch et al., 2002). Éste puede unir el DNA y estimular la transcripción. Se han identificado dos isoformas del mtTFB, TFB1 y TFB2 (Falkenberg et al., 2002). Ambos factores interactúan con la mtRNA polimerasa y uno u otro son necesarios, además del Tfam, para iniciar la transcripción *in vitro*, aunque no parecen ser necesarios en la elongación (Falkenberg et al., 2002). TFB1, además, interactúa con Tfam en el extremo C-terminal (McCulloch y Shadel, 2003), donde se halla el dominio de activación transcripcional de Tfam (Dairaghi et al., 1995).

La inducción de la transcripción mitocondrial por T3 en mitocondrias aisladas (Enriquez et al., 1999) sugiere la existencia de otros factores reguladores. En el mtDNA existen secuencias con homología a los elementos de respuesta a hormonas tiroideas y se ha descrito la existencia de una isoforma de c-Erb A  $\alpha 1$  que puede unir T3 (p43) en la mitocondria (Wrutniak et al., 1995), en secuencias con homología al elemento de respuesta a hormonas tiroideas que se hallan en el *D-loop*. Esto sugiere que p43 puede ser un factor de transcripción mitocondrial dependiente de hormona tiroidea.

## **Transcripción de proteínas mitocondriales codificadas por el genoma mitocondrial.**

Como se ha comentado anteriormente sólo 13 proteínas del sistema OXPHOS son codificadas por el genoma mitocondrial; el resto de proteínas mitocondriales necesarias para la funcionalidad y mantenimiento de la estructura mitocondrial son codificadas por el genoma nuclear. En los últimos años se han descrito dos tipos de moléculas implicadas en la regulación de la expresión de genes que codifican proteínas mitocondriales: los factores

de transcripción, que se unen a los promotores de los genes para regular su expresión y los coactivadores, moléculas reguladoras que no se unen directamente al DNA, pero que ejercen su acción interaccionando con factores de transcripción y otros coactivadores.

## **Papel de los factores de transcripción.**

### **NRF1.**

El estudio del promotor del citocromo c permitió la identificación de un elemento en *cis* necesario para la máxima actividad promotora al que se unía un factor de transcripción denominado NRF-1. La purificación y clonación del NRF-1 humano permitió determinar que NRF-1 es una proteína de 68 kD y su unión al DNA se produce en forma de homodímero a cajas de unión a NRF-1 palindrómicas. La unión se produce a través del contacto con nucleótidos de guanina (Chau et al., 1992; Virbasius et al., 1993a). La fosforilación de una serina en su dominio N-terminal aumenta la afinidad de unión al DNA y su función activadora (Gugneja y Scarpulla, 1997; Herzig et al., 2000).

Numerosos genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales poseen lugares de unión funcionales a NRF-1 (Tabla 1). La expresión de NRF-1 se induce en condiciones en las que se activa el programa de biogénesis mitocondrial (Kelly y Scarpulla, 2004). La delección del gen de NRF-1 en ratones provoca letalidad embrionaria entre los días E3,5 y E6,5 (Huo y Scarpulla, 2001). Los blastocitos K.O. son incapaces de crecer *in vitro* y muestran incapacidad para mantener el  $\Delta\Psi$  y muestran reducción en los niveles de mtDNA.

### **NRF2 (GABP).**

El estudio del promotor del gen de la citocromo oxidasa IV permitió la identificación del NRF2 (Huo y Scarpulla, 2001a). El lugar de unión de NRF2 solapaba con múltiples secuencias GGAA características de los lugares de unión de factores de transcripción de la familia ETS. NRF2 está compuesto por 5 subunidades (Virbasius et al., 1993b); una

## Introducción

	NRF1	NRF2
<b>OXPHOS</b>		
Citocromo c de rata	+	
Citocromo c humano	+	
Subunidad 8 NADH deshidrogenasa humana	+	
Subunidad B succinato deshidrogenasa humano	+	+
Subunidad C succinato deshidrogenasa humano	+	+
Subunidad D succinato deshidrogenasa humano	+	+
Proteína de unión a la ubiquinona humana	+	
Citocromo oxidasa IV de rata		+
Citocromo oxidasa IV de ratón		+
Citocromo oxidasa Vb de ratón	+	+
Citocromo oxidasa Vb de rata	+	+
Citocromo oxidasa Vb humano	+	+
Citocromo oxidasa VIc de rata	+	
Citocromo oxidasa VIaL humano	+	+
Citocromo oxidasa VIIaL bovino	+	+
Citocromo oxidasa VIIaL humano		+
Citocromo oxidasa VIIc bovino		+
ATP sintasa $\gamma$ bovina	+	
ATP sintasa c humana	+	
ATP sintasa $\beta$ humana		+
<b>Replicación y transcripción del mtDNA</b>		
Tfam humano	+	+
Tfam de ratón		+
Tfam de rata		+
MRB RNA de ratón	+	
TFB1 humano	+	
TFB1 de ratón	+	+
TFB2 humano		+
TFB2 de ratón	+	+
<b>Biosíntesis del HEMO</b>		
5-aminolivulinato sintasa de rata	+	
Uroporfirinógeno III sintasa de ratón	+	+
<b>Proteínas de traslocación y ensamblaje</b>		
TOM 20 humano	+	+
Chaperonina 10 de ratón	+	
SURF-1 humano		+
COX17 de ratón	+	+
<b>Canales de iones</b>		
VDAC3 humano	+	
VDAC3 de ratón	+	
VDAC1 humano		+
<b>Transportadores</b>		
Glicerol fosfatasa deshidrogenasa humana		+
<b>Traducción</b>		
Ribosoma mitocondrial humano S12	+	+

**Tabla 1. Genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriales con cajas de unión a NRF1 y NRF2.** Las referencias bibliográficas originales se pueden encontrar en: Kelly y Scarpulla, 2004; Scarpulla, 2002.

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

subunidad  $\alpha$  con capacidad de unión al DNA y otras cuatro que asocian con la subunidad  $\alpha$ , pero que no tienen capacidad de unirse al DNA ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$ ) La clonación de las cinco subunidades desveló que NRF2 era el homólogo humano de GABP (LaMarco y McKnight, 1989) donde  $\beta_1$  y  $\gamma_1$  eran ligeras variantes de *splicing* de las subunidades  $\beta_1$  y  $\beta_2$  del GABP de ratón. Las subunidades sin capacidad de unión al DNA facilitan la unión en forma de heterotetrámeros a las cajas de unión a NRF2 situadas en tándem (Thompson et al., 1991) y poseen el dominio de activación transcripcional (Gugneja et al., 1996). Al igual que con NRF1, el número de genes que codifican proteínas mitocondriales regulados por NRF2 ha ido creciendo en los últimos años (Tabla 1). Recientemente se ha determinado que NRF2 junto con ERR $\alpha$  son los factores de transcripción clave en la regulación de genes del sistema OXPHOS por PGC-1 $\alpha$  (véase más adelante; Mootha et al., 2004). La delección de la subunidad  $\alpha$  del NRF2 es letal, los heterocigotos para la mutación no muestran diferencias fenotípicas y los niveles de expresión no difieren de los animales salvajes (Ristevski et al., 2004).

### **ERR $\alpha$ .**

Como se ha comentado, ERR $\alpha$  es un elemento clave en la regulación de genes del sistema OXPHOS por PGC-1 $\alpha$ . La regulación de ERR $\alpha$  no sólo se limita a genes de la OXPHOS sino que también regula genes implicados en la biogénesis mitocondrial. La inhibición de ERR $\alpha$  compromete seriamente la capacidad de PGC-1 $\alpha$  para inducir la expresión de genes que codifican para proteínas mitocondriales e incrementar el contenido de mtDNA en la célula, mientras que la expresión constitutiva de ERR $\alpha$  es suficiente para provocar ambas respuestas (Schreiber et al., 2004).

ERR $\alpha$  es un receptor nuclear (NR) huérfano capaz de unirse a los elementos de respuesta a hormonas (HRE) como monómero o como homodímero (Giguere, 1999). Su expresión es ubicua, pero los niveles de expresión son mayores en aquellos tejidos con elevados requerimientos energéticos como corazón, músculo esquelético, tejido adiposo marrón o riñón (Sladek et al., 1997). La expresión de ERR $\alpha$  se induce en condiciones de mayor gasto energético y es regulada por PGC-1 $\alpha$  (Schreiber et al., 2003). La delección del gen del



## **Introducción**

ERR $\alpha$  es viable y fértil, su peso corporal se encuentra disminuido al igual que la proporción de grasa. El K.O. es resistente a la obesidad inducida por la dieta sin que haya cambios en el gasto energético o consumo de alimentos. Estas variaciones fenotípicas se deben a una menor expresión tanto de genes reguladores de la adipogénesis como de otros genes del metabolismo energético (Luo et al., 2003).

## **MEF2.**

MEF2 fue descrito inicialmente como un factor de transcripción enriquecido en músculo que se une a una secuencia rica en A/T como homo- o heterodímero (Black y Olson, 1998). Aunque la expresión de MEF2 es elevada en músculo, también lo es en neuronas y en menor medida en otros tipos celulares. En vertebrados existen 4 genes MEF2: MEF2A, B, C y D con patrones de expresión diferentes, pero solapados, a lo largo del desarrollo embrionario y en los tejidos adultos. El calcio, a través de su acción sobre proteínas fosfatasa y proteínas quinasas, las cuales modifican a MEF2 (véase más adelante), regula su actividad transcripcional (McKinsey et al., 2002).

La primera evidencia de que MEF2 podía regular la expresión de genes codificantes para proteínas mitocondriales provino del estudio del promotor de las subunidades de citocromo oxidasa específicas de músculo COX-VIaL y COX-VIII que carecen de cajas de unión a NRF, pero dependen de MEF2 para su expresión (Wan y Moreadith, 1995). El ratón deficiente en MEF2A sufre letalidad perinatal, y aquellos ratones que llegan a la edad adulta muestran reducción en el número de mitocondrias y mtDNA (Naya et al., 2002). La represión de la expresión de MEF2 por medio de la HDAC provoca la disminución de mitocondrias y de la expresión de proteínas mitocondriales así como del regulador de la biogénesis mitocondrial PGC-1 $\alpha$  (Czubryt et al., 2003).

## **Otros factores.**

En general, los genes del sistema OXPHOS y enzimas implicados en el metabolismo mitocondrial carecen de caja TATA y poseen múltiples lugares de unión a Sp1 en el

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

promotor proximal. Sp1 es un factor de transcripción ubicuo perteneciente a la familia de los reguladores transcripcionales Sp/XKLF/*Kruppel-like* que se ha relacionado con la expresión constitutiva de genes implicados en diversas funciones (Suske, 1999). Se ha descrito la activación funcional del promotor de diversos genes del sistema OXPHOS por Sp1, pero no hay evidencias de una regulación controlada de genes de la OXPHOS por Sp1 (Scarpulla, 2002).

PPAR $\alpha$  y  $\delta$  son factores de transcripción de la familia de los receptores nucleares que regulan la expresión de enzimas implicados en la oxidación de ácidos grasos (Gulick et al., 1994; Wang et al., 2003; Tanaka et al., 2003). PPAR $\gamma$  tiene un papel regulador en la diferenciación del tejido adiposo (Rosen et al., 2000) aunque no se ha asociado a la expresión de genes de la OXPHOS, pero sí a la proteína desacopladora del tejido adiposo marrón UCP1, que junto a los receptores de hormona tiroidea y ácido retinoico actúa en el *enhancer* de su promotor (Silva y Rabelo, 1997).

La estimulación eléctrica de miocitos cardíacos produce aumento en la masa y la actividad mitocondrial. La inducción del citocromo c viene precedida por incrementos en el mRNA de c-Fos, c-Jun, B-Jun y NRF1 (Xia et al., 1997), Posteriormente se demostró un papel funcional de c-Jun y c-Fos en la activación del promotor del citocromo c en colaboración con NRF-1 (Xia et al., 1998).

CREB es otro factor de transcripción relacionado con la expresión de genes codificantes de proteínas mitocondriales como el citocromo c (Herzig et al., 2000b), la HMG-CoA (Eggers et al., 2000) o la L-CPTI (Louet et al., 2002). CREB regula la expresión de PGC-1 $\alpha$  en músculo esquelético (Handschin et al., 2003).

El doble KO de NFATc3 y NFATc4 muestra en el tejido cardíaco defectos mitocondriales tanto estructurales como funcionales en ausencia de cambios notables en la expresión de la mayoría de genes implicados en la biogénesis y el metabolismo mitocondrial salvo la *fatty acid binding protein* de tipo cardíaco y la piruvato carboxilasa (Bushdid et al., 2003), pero no se ha demostrado un efecto directo de miembros de la familia NFAT sobre el promotor de estos genes.

## Introducción

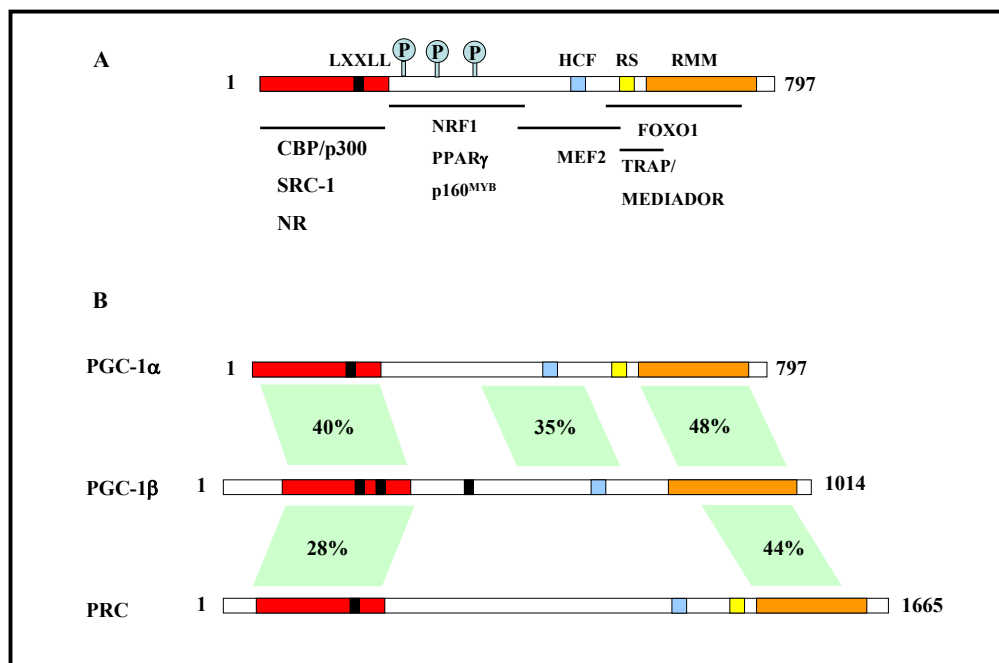
### **Papel de los coactivadores nucleares.**

El programa de biogénesis mitocondrial requiere la expresión coordinada de múltiples genes regulados por diversos factores de transcripción. Es mediante los coactivadores como se coordina la expresión de los genes necesarios para la función mitocondrial y su biogénesis.

### **PGC-1 $\alpha$ .**

PGC-1 $\alpha$  fue clonado en una búsqueda por doble híbrido de factores que interaccionaban con PPAR $\gamma$  en el TAM (Puigserver et al., 1998). La expresión de PGC-1 $\alpha$  es abundante en corazón, músculo esquelético, TAM, cerebro, hígado y riñón, tejidos todos ellos con especiales requerimientos energéticos. Su expresión se induce en diferentes tejidos por la exposición al frío, el ejercicio y el ayuno, condiciones en las que aumenta la demanda energética para producir calor o ATP (Puigserver y Spiegelman, 2003). La sobreexpresión de PGC-1 $\alpha$  en distintas líneas celulares induce la expresión de NRF1, NRF2, Tfam y ERR $\alpha$ , estimula la respiración mitocondrial acoplada o desacoplada y la biogénesis mitocondrial (Puigserver et al., 1998; Schreiber et al., 2004; Wu et al., 1999). La sobreexpresión de PGC-1 $\alpha$  en corazón provoca un gran aumento en la cantidad de mitocondrias (Lehman et al., 2000). Ratones transgénicos que sobreexpresan PGC-1 $\alpha$  en músculo esquelético tienen una mayor proporción de fibras musculares oxidativas tipo I y un aumento en la expresión de genes del metabolismo mitocondrial, la coactivación a MEF2 es responsable en parte de este cambio (Lin et al., 2002b; Miura et al., 2003). Además, en hígado PGC-1 $\alpha$  regula la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis (Yoon et al., 2001) y en las células beta del páncreas altera la expresión de diversos genes metabólicos provocando la supresión de la liberación de insulina mediada por glucosa (Yoon et al., 2003). El ratón *knock-out* de PGC-1 $\alpha$  tiene reducida su actividad mitocondrial, pero paradójicamente es delgado y resistente a la obesidad inducida por la dieta. Este fenotipo se explica por una hiperactividad provocada por lesiones en la región del cerebro que controlan el movimiento (Lin et al., 2004).

PGC-1 $\alpha$  posee en su N-terminal un dominio de activación transcripcional con el cual interacciona con SRC-1 y CBP/p300 (Figura 2; Puigserver et al., 1999). En esta región se



**Figura 2. Dominios funcionales de la familia PGC-1.** A.- PGC-1 $\alpha$  posee un potente dominio de activación en el extremo N-terminal (rojo) que le permite la interacción con otros coactivadores transcripcionales. El dominio LXXL (negro) es responsable de la interacción dependiente de ligando con ciertos receptores nucleares. Un dominio central contiene varios lugares de fosforilación por la quinasa p38 MAPK. El dominio HCF (azul) le permite la interacción con el *Host Cell Factor* 1. El extremo C-terminal contiene los dominios de procesamiento del RNA, el motivo de reconocimiento del RNA (RRM; naranja) y una zona rica en serinas y argininas (RS; amarillo). B.- Representación esquemática de los dominios de los tres miembros de la familia PGC-1. Se indica el porcentaje de homología entre los distintos dominios de PGC-1. (Adaptado de Puigserver y Spiegelman, 2003)

encuentra el motivo LXXLL con el cual interacciona con la mayor parte de los receptores nucleares (Puigserver y Spiegelman, 2003). De modo independiente de ligando también interacciona con PPAR $\gamma$  en un dominio entre los aminoácidos 200 y 400 (Puigserver et al., 1998). En este mismo dominio PGC-1 $\alpha$  es el responsable de la unión y coactivación de NRF1 (Wu et al., 1999a). No se ha demostrado una interacción directa de PGC-1 $\alpha$  con NRF2, pero PGC-1 $\alpha$  y  $\beta$  interaccionan con el factor denominado *Host Cell Factor* (HCF-1), una proteína implicada en el ciclo celular y la infección viral (Lin et al., 2002a). Se ha demostrado la interacción de HCF-1 con NRF2 (Vogel y Kristie, 2000). HCF-1 podría

## Introducción

servir de puente en la coactivación de miembros de la familia de PGC-1 con NRF2 aunque el complejo heterotrimérico PGC-1-HCF-1-NRF2 aún no se ha demostrado. Un dominio entre los aminoácidos 400 y 500 permiten su interacción con MEF2 (Michael et al., 2001). El dominio C-terminal de PGC-1 $\alpha$  permite su interacción con FOX1 (Puigserver et al., 2003).

Muchos coactivadores activan la transcripción remodelando la cromatina gracias a que poseen actividades enzimáticas específicas tales como acetil transferasas (Naar et al., 2001). PGC-1 $\alpha$  no posee secuencias con homología a otros coactivadores. El modo en el que activa la transcripción es reclutando moléculas con actividad Histona Acetil Transferasas (HAT) como SRC-1 y CBP/p300 (Puigserver et al., 1999). TIF-2 atenúa la interacción de PGC-1 $\alpha$  con SRC-1 (Picard et al., 2002). Además de interactuar con proteínas con capacidad de modificar la cromatina, PGC-1 $\alpha$  también interacciona con el complejo de preiniciación de la transcripción a través de TRAP/Mediador (Wallberg et al., 2003). PGC-1 $\alpha$  posee dominios implicados en el procesamiento del RNA, de hecho se ha visto asociado a complejos con la forma fosforilada de la RNA polimerasa II y en estudios de procesamiento del mRNA se ha demostrado un papel en el *splicing* del mRNA sólo de genes en los que PGC-1 $\alpha$  se une a su promotor (Monsalve et al., 2000).

La fosforilación de PGC-1 $\alpha$  por la p38 MAPK aumenta su estabilidad y vida media (Puigserver et al., 2001) y desestabiliza la unión con su represor p160 *myb binding protein* (p160<sup>MBP</sup>; Fan et al., 2004).

### **PGC-1 related coactivator (PRC).**

PGC-1 $\alpha$  tiene un patrón de expresión restringido y su expresión no se detecta en algunas líneas proliferativas con la función mitocondrial activa. Esto sugirió la existencia de otro coactivador capaz de regular la función mitocondrial. PRC se identificó en una búsqueda en las bases de datos (Andersson y Scarpulla, 2001). PRC contiene varios dominios de homología con PGC-1 $\alpha$ , entre ellos la región N-terminal, el dominio LXXLL de interacción con los NR, una zona rica en prolinas y regiones de interacción con el RNA en el C-terminal (Fig. 2; Andersson y Scarpulla, 2001). La mayor similitud entre PGC-1 $\alpha$  y

### **Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético**

PRC se halla en los dominios N- y C-terminales con un 48 y 46% respectivamente (Kressler et al., 2002). PRC interacciona y activa a NRF1 en el promotor de la 5-ALAS, también activa el promotor de citocromo c, pero para ello además de NRF1 necesita la colaboración de CREB (Andersson y Scarpulla, 2001). La expresión de PRC es ubicua y a diferencia de PGC-1 $\alpha$  su expresión no aumenta en respuesta al frío, pero muestra una regulación dependiente del ciclo celular por lo que se sugiere que PRC actúa en respuesta a señales proliferativas (Andersson y Scarpulla, 2001).

#### **PGC-1 $\beta$ (PERC).**

PGC-1 $\beta$  fue identificado también en una búsqueda en las bases de datos (Kressler et al., 2002; Lin et al., 2002a). Su homología con PGC-1 $\alpha$  es mayor que la de PERC (Fig. 2). En el extremo N-terminal muestra una identidad del 40% con PGC-1 $\alpha$  y de un 28% con PRC (Lin et al., 2002d). En el extremo C-terminal la identidad es de un 48% con PGC-1 $\alpha$  y de un 46% con PRC (Lin et al., 2002a). A diferencia de los otros dos miembros de la familia, PGC-1 $\beta$  no posee la secuencia rica en serinas y prolina que permite la interacción con la maquinaria de procesamiento del RNA. El patrón de expresión de PGC-1 $\beta$  es similar al de PGC-1 $\alpha$ , pero su expresión no es inducida en respuesta al frío (Lin et al., 2002a). El ayuno induce fuertemente la expresión de PGC-1 $\alpha$  y  $\beta$  en el hígado provocando un aumento en la expresión de genes mitocondriales, pero a diferencia de PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  no regula la expresión de genes gluconeogénicos posiblemente por una menor afinidad con HNF-4 $\alpha$  y FOXO1 (Lin et al., 2003). PGC-1 $\beta$  coactiva a NRF1, HNF-4 $\alpha$  (Lin et al., 2002a), ER (Kressler et al., 2002) y ERR (Kamei et al., 2003). Ratones transgénicos de PGC-1 $\beta$  exhiben un incremento en la expresión de MCDA, un elevado gasto energético y son resistente a la obesidad inducida por la dieta (Kamei et al., 2003).

PGC-1 $\alpha$  y  $\beta$  incrementan la masa y la respiración mitocondrial, pero la proporción de respiración desacoplada es mayor en aquellas células con mayor expresión de PGC-1 $\alpha$  (St Pierre et al., 2003).

# Señalización en el control de la biogénesis mitocondrial.

## Calcio.

El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es un segundo mensajero intracelular que ha sido ampliamente estudiado. Incrementos en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre en células L6 inducido por un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  provocan un aumento en la biogénesis mitocondrial; en estas condiciones, se detecta un incremento en la expresión de PGC-1, NRF1, NRF2 y Tfam (Ojuka et al., 2003). La elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa diversas proteínas quinasas y proteínas fosfatasa que activan cascadas de señalización cuyo resultado final es la modificación de la transcripción de determinados genes. Posiblemente la proteína quinasa más relevante en el control de la biogénesis mitocondrial inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  es la quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK). De las tres CaMK (CaMKI, CaMKII y CaMKIV), CaMKI y CaMKII muestran una expresión general mientras que la expresión de CaMKIV se limita principalmente al cerebro, linfocitos T y células germinales masculinas (Anderson y Kane, 1998). Las CaMK fosforilan serinas/treoninas en una gran variedad de substratos (Anderson y Kane, 1998). CaMKI y CaMKIV muestran una capacidad similar de activar genes (Kane y Means, 2000; Wu et al., 2002). Los ratones transgénicos que expresan una forma constitutivamente activa de CaMKIV muestran un aumento en la biogénesis mitocondrial y de proteínas y enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos y la OXPHOS, así como PGC-1 $\alpha$  (Wu et al., 2002). Recientemente se ha descrito el ratón K.O. de CaMKIV (Akimoto et al., 2004), el cual no presenta anormalidades mitocondriales en el músculo esquelético. La función observada en el transgénico de CaMKIV puede ser llevada a cabo por CaMKI que a diferencia de CaMKIV se expresa abundantemente en músculo y muestra una capacidad similar a la de CaMKIV activando genes en un *background* muscular (Wu et al., 2002). CaMK es capaz de activar PGC-1 $\alpha$  a nivel transcripcional (Handschin et al., 2003; Wu et al., 2002). CaMK activa CREB y MEF2 los cuales actúan en el promotor de PGC-1 $\alpha$  (Czubryt et al., 2003; Handschin et al., 2003). La expresión ectópica de CaMK incrementa la actividad transcripcional de MEF2 sin cambiar la afinidad de MEF2 al DNA (Passier et al., 2000). Se ha demostrado que la fosforilación de MEF2D por CaMK incrementa su actividad

### **Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético**

transcripcional (Blaeser et al., 2000). CaMK también incrementa la actividad transcripcional de MEF2 rompiendo la asociación de MEF2 con los represores HDAC 4, 5, 7 y 9 por fosforilación de estos últimos (Lu et al., 2000). Aunque no se conoce el mecanismo preciso, CaMKIV regula la función transcripcional del coactivador asociado a PGC-1 $\alpha$ , CBP/p300 (Chawla et al., 1998).

La proteína fosfatasa calcineurina también estimula la biogénesis mitocondrial y la transcripción de PGC-1 $\alpha$ , aunque lo hace en menor medida que CaMK (Wu et al., 2002). La calcineurina es capaz de activar a MEF2 (Wu et al., 2000; Wu et al., 2001) el cual actúa sobre el promotor de PGC-1 $\alpha$  (Handschin et al., 2003). Así mismo, la calcineurina desfosforila al factor de transcripción NFAT y ello permite la traslocación de NFAT del citoplasma al núcleo. La activación de NFAT está implicada en la transición de la fibra muscular de contracción rápida a contracción lenta (Crabtree y Olson, 2002; Olson y Williams, 2000a), pero no está claro el papel de NFAT en la regulación de la biogénesis mitocondrial.

El aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> activa a la proteína quinasa C que se ha visto implicada en la regulación transcripcional del gen del citocromo c (Freyssenet et al., 1999).

### **Estado energético de la célula.**

Existen varias evidencias de que el descenso en la relación ATP/AMP es responsable de aumentos en la masa mitocondrial. Muchos estudios indican un aumento en la expresión de NRF1 en respuesta a la contracción en músculo esquelético (Hood, 2001). El desacoplamiento de la respiración por la sobreexpresión de UCP1 en células HeLa provoca el incremento de NRF1 y diversas proteínas mitocondriales (Li et al., 1999). El tratamiento de ratas con ácido  $\beta$ -guanidinopropionico, que reduce los niveles de fosfocreatina y ATP, conlleva una activación de NRF1 y un incremento en la masa mitocondrial (Bergeron et al., 2001). Este tratamiento provoca la activación de la quinasa dependiente de AMP (AMPK). La activación de la AMPK en músculo esquelético de ratas tratadas crónicamente con AICAR provoca el incremento de varias enzimas mitocondriales (Winder et al., 2000). La



## **Introducción**

activación de AMPK se asocia a aumentos en la expresión de PGC-1 $\alpha$  en músculo esquelético (Zong et al., 2002).

### **Estimulación adrenérgica.**

En tejidos con capacidad termogénica, como el TAM, la señalización  $\beta$ -adrenérgica y activación de la cAMP estimulan la respiración desacoplada y el incremento de la masa mitocondrial (Puigserver et al., 1998). El tratamiento de la línea celular de adipocitos marrones HIB-1B con el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol induce la expresión de PGC-1 $\alpha$ . Receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) median la inducción de PGC-1 $\alpha$  pues ratones KO del  $\beta$ -AR no muestran inducción de PGC-1 $\alpha$  en TAM al ser expuestos al frío (Puigserver y Spiegelman, 2003) y tratamientos con agonistas específicos del  $\beta$ -AR inducen la expresión de PGC-1 $\alpha$  en TAM (Gomez-Ambrosi et al., 2001).

### **Óxido nítrico (NO).**

El NO actúa sobre la mitocondria a distintos niveles. El NO es un vasodilatador que regula el flujo sanguíneo a los tejidos y por tanto el suministro de oxígeno y sustratos del metabolismo mitocondrial (Nisoli et al., 2004). Además el NO regula directamente la unión del oxígeno a la hemoglobina (Wolzt et al., 1999). El NO regula la función mitocondrial uniéndose a la citocromo c oxidasa en competición con el oxígeno inhibiendo a la enzima (Cleeter et al., 1994). Recientemente han surgido evidencias que el NO activa la biogénesis mitocondrial en varios tipos celulares incluyendo adipocitos y HeLa (Nisoli et al., 2003). La actividad termogénica y masa mitocondrial de animales KO de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) se halla significativamente alterada (Nisoli et al., 2003). Los efectos del NO en la biogénesis mitocondrial son dependientes de cGMP y se asocian a la activación de PGC-1 $\alpha$  (Nisoli et al., 2003). Cabe destacar que la e-NOS se activa por AMPK, por incrementos en la concentración de Ca<sup>2+</sup> y por señalización  $\beta$ -adrenérgica (Nisoli et al., 2004).

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

### Reference List

Akimoto, T., Ribar, T.J., Williams, R.S., and Yan, Z. (2004). Skeletal muscle adaptation in response to voluntary running in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV-deficient mice. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 287, C1311-C1319.

Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (1988). Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* 107, 481-495.

Anderson, K.A. and Kane, C.D. (1998a). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV and calcium signaling. *Biometals* 11, 331-343.

Anderson, K.A. and Kane, C.D. (1998b). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV and calcium signaling. *Biometals* 11, 331-343.

Andersson, U. and Scarpulla, R.C. (2001a). Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 21, 3738-3749.

Andersson, U. and Scarpulla, R.C. (2001b). Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 21, 3738-3749.

Andersson, U. and Scarpulla, R.C. (2001c). Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 21, 3738-3749.

Andersson, U. and Scarpulla, R.C. (2001d). Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 21, 3738-3749.

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermoud, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R., and Martinou, J.C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372.

Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacin, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., and Zorzano, A. (2003a). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190-17197.

Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacin, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., and Zorzano, A. (2003b). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190-17197.

## Introducción

Basanez,G., Nechushtan,A., Drozhinin,O., Chanturiya,A., Choe,E., Tutt,S., Wood,K.A., Hsu,Y., Zimmerberg,J., and Youle,R.J. (1999). Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 5492-5497.

Bereiter-Hahn,J. and Voth,M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* **27**, 198-219.

Bergeron,R., Ren,J.M., Cadman,K.S., Moore,I.K., Perret,P., Pypaert,M., Young,L.H., Semenkovich,C.F., and Shulman,G.I. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **281**, E1340-E1346.

Bernardi,P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* **79**, 1127-1155.

Black,B.L. and Olson,E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 167-196.

Blaeser,F., Ho,N., Prywes,R., and Chatila,T.A. (2000). Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J. Biol. Chem.* **275**, 197-209.

Bogenhagen,D.F. and Clayton,D.A. (2003). The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 357-360.

Breckenridge,D.G., Stojanovic,M., Marcellus,R.C., and Shore,G.C. (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J. Cell Biol.* **160**, 1115-1127.

Bushdid,P.B., Osinska,H., Waclaw,R.R., Molkentin,J.D., and Yutzey,K.E. (2003a). NFATc3 and NFATc4 are required for cardiac development and mitochondrial function. *Circ. Res.* **92**, 1305-1313.

Bushdid,P.B., Osinska,H., Waclaw,R.R., Molkentin,J.D., and Yutzey,K.E. (2003b). NFATc3 and NFATc4 are required for cardiac development and mitochondrial function. *Circ. Res.* **92**, 1305-1313.

Chau,C.M., Evans,M.J., and Scarpulla,R.C. (1992). Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *J. Biol. Chem.* **267**, 6999-7006.

Chawla,S., Hardingham,G.E., Quinn,D.R., and Bading,H. (1998). CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* **281**, 1505-1509.

Chen,H., Detmer,S.A., Ewald,A.J., Griffin,E.E., Fraser,S.E., and Chan,D.C. (2003a). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* **160**, 189-200.

Chen,H., Detmer,S.A., Ewald,A.J., Griffin,E.E., Fraser,S.E., and Chan,D.C. (2003b). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* **160**, 189-200.

Chen,K.H., Guo,X., Ma,D., Guo,Y., Li,Q., Yang,D., Li,P., Qiu,X., Wen,S., Xiao,R.P., and Tang,J. (2004). Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat. Cell Biol.* **6**, 872-883.

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

- Chung,J.G., Yeh,K.T., Wu,S.L., Hsu,N.Y., Chen,G.W., Yeh,Y.W., and Ho,H.C. (2001b). Novel transmembrane GTPase of non-small cell lung cancer identified by mRNA differential display. *Cancer Res.* *61*, 8873-8879.
- Chung,J.G., Yeh,K.T., Wu,S.L., Hsu,N.Y., Chen,G.W., Yeh,Y.W., and Ho,H.C. (2001a). Novel transmembrane GTPase of non-small cell lung cancer identified by mRNA differential display. *Cancer Res.* *61*, 8873-8879.
- Clayton,D.A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Hum. Reprod.* *15 Suppl* *2:11-7.*, 11-17.
- Cleeter,M.W., Cooper,J.M., Darley-Usmar,V.M., Moncada,S., and Schapira,A.H. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* *345*, 50-54.
- Crabtree,G.R. and Olson,E.N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* *109 Suppl*, S67-S79.
- Czubryt,M.P., McAnally,J., Fishman,G.I., and Olson,E.N. (2003b). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha ) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 1711-1716.
- Czubryt,M.P., McAnally,J., Fishman,G.I., and Olson,E.N. (2003a). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha ) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 1711-1716.
- Dairaghi,D.J., Shadel,G.S., and Clayton,D.A. (1995). Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *J. Mol. Biol.* *249*, 11-28.
- Desagher,S. and Martinou,J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* *10*, 369-377.
- Eggers,A., Caudevilla,C., Asins,G., Hegardt,F.G., and Serra,D. (2000). Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase promoter contains a CREB binding site that regulates cAMP action in Caco-2 cells. *Biochem. J.* *345 Pt 2:201-6.*, 201-206.
- Enriquez,J.A., Fernandez-Silva,P., Garrido-Perez,N., Lopez-Perez,M.J., Perez-Martos,A., and Montoya,J. (1999). Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone. *Mol. Cell Biol.* *19*, 657-670.
- Falkenberg,M., Gaspari,M., Rantanen,A., Trifunovic,A., Larsson,N.G., and Gustafsson,C.M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat. Genet.* *31*, 289-294.
- Fan,M., Rhee,J., St Pierre,J., Handschin,C., Puigserver,P., Lin,J., Jaeger,S., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Spiegelman,B.M. (2004). Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes Dev.* *18*, 278-289.
- Fisher,R.P. and Clayton,D.A. (1985). A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J. Biol. Chem.* *260*, 11330-11338.

## Introducción

Fisher,R.P., Topper,J.N., and Clayton,D.A. (1987). Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements. *Cell* 50, 247-258.

Frank,S., Gaume,B., Bergmann-Leitner,E.S., Leitner,W.W., Robert,E.G., Catez,F., Smith,C.L., and Youle,R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* 1, 515-525.

Freyssenet,D., Di Carlo,M., and Hood,D.A. (1999). Calcium-dependent regulation of cytochrome c gene expression in skeletal muscle cells. Identification of a protein kinase c-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 9305-9311.

Fritz,S., Rapaport,D., Klanner,E., Neupert,W., and Westermann,B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* 152, 683-692.

Garesse,R. and Vallejo,C.G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263, 1-16.

Giguere,V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20, 689-725.

Gomez-Ambrosi,J., Fruhbeck,G., and Martinez,J.A. (2001). Rapid in vivo PGC-1 mRNA upregulation in brown adipose tissue of Wistar rats by a beta(3)-adrenergic agonist and lack of effect of leptin. *Mol. Cell Endocrinol.* 176, 85-90.

Griparic,L. and van der Bliek,A.M. (2001). The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic.* 2, 235-244.

Gugneja,S. and Scarpulla,R.C. (1997). Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J. Biol. Chem.* 272, 18732-18739.

Gugneja,S., Virbasius,C.M., and Scarpulla,R.C. (1996). Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription. *Mol. Cell Biol.* 16, 5708-5716.

Gulick,T., Cresci,S., Caira,T., Moore,D.D., and Kelly,D.P. (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 11012-11016.

Hales,K.G. and Fuller,M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121-129.

Handschin,C., Rhee,J., Lin,J., Tarr,P.T., and Spiegelman,B.M. (2003d). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7111-7116.

Handschin,C., Rhee,J., Lin,J., Tarr,P.T., and Spiegelman,B.M. (2003c). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7111-7116.

Handschin,C., Rhee,J., Lin,J., Tarr,P.T., and Spiegelman,B.M. (2003a). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7111-7116.

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

Handschin,C., Rhee,J., Lin,J., Tarr,P.T., and Spiegelman,B.M. (2003b). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 7111-7116.

Heddi,A., Lestienne,P., Wallace,D.C., and Stepien,G. (1993). Mitochondrial DNA expression in mitochondrial myopathies and coordinated expression of nuclear genes involved in ATP production. *J. Biol. Chem.* *268*, 12156-12163.

Hermann,G.J., Thatcher,J.W., Mills,J.P., Hales,K.G., Fuller,M.T., Nunnari,J., and Shaw,J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* *143*, 359-373.

Herzig,R.P., Scacco,S., and Scarpulla,R.C. (2000b). Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* *275*, 13134-13141.

Herzig,R.P., Scacco,S., and Scarpulla,R.C. (2000a). Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* *275*, 13134-13141.

Hood,D.A. (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* *90*, 1137-1157.

Hsu,Y.T., Wolter,K.G., and Youle,R.J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 3668-3672.

Huo,L. and Scarpulla,R.C. (2001b). Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol. Cell Biol.* *21*, 644-654.

Huo,L. and Scarpulla,R.C. (2001a). Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol. Cell Biol.* *21*, 644-654.

Kamei,Y., Ohizumi,H., Fujitani,Y., Nemoto,T., Tanaka,T., Takahashi,N., Kawada,T., Miyoshi,M., Ezaki,O., and Kakizuka,A. (2003a). PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 12378-12383.

Kamei,Y., Ohizumi,H., Fujitani,Y., Nemoto,T., Tanaka,T., Takahashi,N., Kawada,T., Miyoshi,M., Ezaki,O., and Kakizuka,A. (2003b). PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 12378-12383.

Kane,C.D. and Means,A.R. (2000). Activation of orphan receptor-mediated transcription by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV. *EMBO J.* *19*, 691-701.

Karbowski,M., Lee,Y.J., Gaume,B., Jeong,S.Y., Frank,S., Nechushtan,A., Santel,A., Fuller,M., Smith,C.L., and Youle,R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* *159*, 931-938.

Karbowski,M. and Youle,R.J. (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death. Differ.* *10*, 870-880.

## Introducción

Kay, B.K., Williamson, M.P., and 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.

Kelly, D.P. and Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 18, 357-368.

Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusins complexes. *Science* 305, 858-862.

Kressler, D., Schreiber, S.N., Knutti, D., and Kralli, A. (2002a). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 13918-13925.

Kressler, D., Schreiber, S.N., Knutti, D., and Kralli, A. (2002b). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 13918-13925.

Kressler, D., Schreiber, S.N., Knutti, D., and Kralli, A. (2002c). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 13918-13925.

LaMarco, K.L. and McKnight, S.L. (1989). Purification of a set of cellular polypeptides that bind to the purine-rich cis-regulatory element of herpes simplex virus immediate early genes. *Genes Dev.* 3, 1372-1383.

Larsson, N.G., Oldfors, A., Holme, E., and Clayton, D.A. (1994). Low levels of mitochondrial transcription factor A in mitochondrial DNA depletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 1374-1381.

Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., and 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.

Lehman, J.J., Barger, P.M., Kovacs, A., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., and Kelly, D.P. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest* 106, 847-856.

Li, B., Holloszy, J.O., and Semenkovich, C.F. (1999). Respiratory uncoupling induces delta-aminolevulinic acid synthase expression through a nuclear respiratory factor-1-dependent mechanism in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 274, 17534-17540.

Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B.M. (2002a). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* 277, 1645-1648.

Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B.M. (2002b). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* 277, 1645-1648.

Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B.M. (2002c). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* 277, 1645-1648.

Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B.M. (2002d). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* 277, 1645-1648.

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B.M. (2002e). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* 277, 1645-1648.

Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B.M. (2002f). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* 277, 1645-1648.

Lin, J., Tarr, P.T., Yang, R., Rhee, J., Puigserver, P., Newgard, C.B., and Spiegelman, B.M. (2003). PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 30843-30848.

Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., Lowell, B.B., Bassel-Duby, R., and Spiegelman, B.M. (2002g). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797-801.

Lin, J., Wu, P.H., Tarr, P.T., Lindenberg, K.S., St Pierre, J., Zhang, C.Y., Mootha, V.K., Jager, S., Vianna, C.R., Reznick, R.M., Cui, L., Manieri, M., Donovan, M.X., Wu, Z., Cooper, M.P., Fan, M.C., Rohas, L.M., Zavacki, A.M., Cinti, S., Shulman, G.I., Lowell, B.B., Krainc, D., and Spiegelman, B.M. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* 119, 121-135.

Louet, J.F., Hayhurst, G., Gonzalez, F.J., Girard, J., and Decaux, J.F. (2002). The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J. Biol. Chem.* 277, 37991-38000.

Lu, J., McKinsey, T.A., Nicol, R.L., and Olson, E.N. (2000). Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4070-4075.

Luo, J., Sladek, R., Carrier, J., Bader, J.A., Richard, D., and Giguere, V. (2003). Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol. Cell Biol.* 23, 7947-7956.

McCulloch, V., Seidel-Rogol, B.L., and Shadel, G.S. (2002). A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol. Cell Biol.* 22, 1116-1125.

McCulloch, V. and Shadel, G.S. (2003). Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Mol. Cell Biol.* 23, 5816-5824.

McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. (2002). MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem. Sci.* 27, 40-47.

Meeusen, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747-1752.

Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P., and Spiegelman, B.M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 3820-3825.



## Introducción

Miura,S., Kai,Y., Ono,M., and Ezaki,O. (2003). Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha down-regulates GLUT4 mRNA in skeletal muscles. *J. Biol. Chem.* 278, 31385-31390.

Monsalve,M., Wu,Z., Adelmant,G., Puigserver,P., Fan,M., and Spiegelman,B.M. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol. Cell* 6, 307-316.

Mootha,V.K., Handschin,C., Arlow,D., Xie,X., St Pierre,J., Sihag,S., Yang,W., Altshuler,D., Puigserver,P., Patterson,N., Willy,P.J., Schulman,I.G., Heyman,R.A., Lander,E.S., and Spiegelman,B.M. (2004). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6570-6575.

Mozdy,A.D. and Shaw,J.M. (2003). A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 468-478.

Naar,A.M., Lemon,B.D., and Tjian,R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 70:475-501., 475-501.

Nakada,K., Inoue,K., Ono,T., Isobe,K., Ogura,A., Goto,Y.I., Nonaka,I., and Hayashi,J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat. Med.* 7, 934-940.

Naya,F.J., Black,B.L., Wu,H., Bassel-Duby,R., Richardson,J.A., Hill,J.A., and Olson,E.N. (2002). Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nat. Med.* 8, 1303-1309.

Nechushtan,A., Smith,C.L., Lamensdorf,I., Yoon,S.H., and Youle,R.J. (2001). Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J. Cell Biol.* 153, 1265-1276.

Nisoli,E., Clementi,E., Moncada,S., and Carruba,M.O. (2004a). Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1-15.

Nisoli,E., Clementi,E., Moncada,S., and Carruba,M.O. (2004b). Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1-15.

Nisoli,E., Clementi,E., Paolucci,C., Cozzi,V., Tonello,C., Sciorati,C., Bracale,R., Valerio,A., Francolini,M., Moncada,S., and Carruba,M.O. (2003a). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299, 896-899.

Nisoli,E., Clementi,E., Paolucci,C., Cozzi,V., Tonello,C., Sciorati,C., Bracale,R., Valerio,A., Francolini,M., Moncada,S., and Carruba,M.O. (2003b). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299, 896-899.

Nisoli,E., Clementi,E., Paolucci,C., Cozzi,V., Tonello,C., Sciorati,C., Bracale,R., Valerio,A., Francolini,M., Moncada,S., and Carruba,M.O. (2003c). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299, 896-899.

Ojuka,E.O., Jones,T.E., Han,D.H., Chen,M., and Holloszy,J.O. (2003). Raising Ca<sup>2+</sup> in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J.* 17, 675-681.

Olichon,A., Emorine,L.J., Descoins,E., Pelloquin,L., Bricchese,L., Gas,N., Guillou,E., Delettre,C., Valette,A., Hamel,C.P., Ducommun,B., Lenaers,G., and Belenguer,P. (2002). The human dynamin-

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* **523**, 171-176.

Olson, E.N. and Williams, R.S. (2000). Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* **101**, 689-692.

Parisi, M.A., Xu, B., and Clayton, D.A. (1993). A human mitochondrial transcriptional activator can functionally replace a yeast mitochondrial HMG-box protein both in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.* **13**, 1951-1961.

Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F.J., Nicol, R.L., McKinsey, T.A., Overbeek, P., Richardson, J.A., Grant, S.R., and Olson, E.N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J. Clin. Invest.* **105**, 1395-1406.

Picard, F., Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W., Chambon, P., and Auwerx, J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* **111**, 931-941.

Poulton, J., Morten, K., Freeman-Emmerson, C., Potter, C., Sewry, C., Dubowitz, V., Kidd, H., Stephenson, J., Whitehouse, W., and Hansen, F.J. (1994). Deficiency of the human mitochondrial transcription factor h-mtTFA in infantile mitochondrial myopathy is associated with mtDNA depletion. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1763-1769.

Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., and Spiegelman, B.M. (1999a). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* **286**, 1368-1371.

Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., and Spiegelman, B.M. (1999b). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* **286**, 1368-1371.

Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., and Spiegelman, B.M. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**, 550-555.

Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J.C., Zhang, C.Y., Krauss, S., Mootha, V.K., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol. Cell* **8**, 971-982.

Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2003a). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* **24**, 78-90.

Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2003b). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* **24**, 78-90.

Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2003c). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* **24**, 78-90.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998a). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.

## Introducción

Puigserver,P., Wu,Z., Park,C.W., Graves,R., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998b). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.

Puigserver,P., Wu,Z., Park,C.W., Graves,R., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998c). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.

Puigserver,P., Wu,Z., Park,C.W., Graves,R., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998d). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.

Puntschart,A., Claassen,H., Jostarndt,K., Hoppeler,H., and Billeter,R. (1995). mRNAs of enzymes involved in energy metabolism and mtDNA are increased in endurance-trained athletes. *Am. J. Physiol* 269, C619-C625.

Rapaport,D., Brunner,M., Neupert,W., and Westermann,B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 20150-20155.

Ristevski,S., O'Leary,D.A., Thornell,A.P., Owen,M.J., Kola,I., and Hertzog,P.J. (2004). The ETS transcription factor GABPalph is essential for early embryogenesis. *Mol. Cell Biol.* 24, 5844-5849.

Rojo,M., Legros,F., Chateau,D., and Lombes,A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* 115, 1663-1674.

Rosen,E.D., Walkey,C.J., Puigserver,P., and Spiegelman,B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293-1307.

Santel,A., Frank,S., Gaume,B., Herrler,M., Youle,R.J., and Fuller,M.T. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 116, 2763-2774.

Santel,A. and Fuller,M.T. (2001b). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114, 867-874.

Santel,A. and Fuller,M.T. (2001a). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* 114, 867-874.

Satoh,M., Hamamoto,T., Seo,N., Kagawa,Y., and Endo,H. (2003). Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 482-493.

Scarpulla,R.C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1576, 1-14.

Schlesinger,P.H., Gross,A., Yin,X.M., Yamamoto,K., Saito,M., Waksman,G., and Korsmeyer,S.J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 11357-11362.

Schreiber,S.N., Emter,R., Hock,M.B., Knutti,D., Cardenas,J., Podvinec,M., Oakeley,E.J., and Kralli,A. (2004a). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6472-6477.

Schreiber,S.N., Emter,R., Hock,M.B., Knutti,D., Cardenas,J., Podvinec,M., Oakeley,E.J., and Kralli,A. (2004b). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 6472-6477.

Schreiber,S.N., Knutti,D., Brogli,K., Uhlmann,T., and Kralli,A. (2003). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J. Biol. Chem.* *278*, 9013-9018.

Sesaki,H. and Jensen,R.E. (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* *152*, 1123-1134.

Sesaki,H. and Jensen,R.E. (2004). Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J. Biol. Chem.* *279*, 28298-28303.

Shaw,J.M. and Nunnari,J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* *12*, 178-184.

Silva,J.E. and Rabelo,R. (1997). Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur. J. Endocrinol.* *136*, 251-264.

Skulachev,V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 23-29.

Sladek,R., Bader,J.A., and Giguere,V. (1997). The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol. Cell Biol.* *17*, 5400-5409.

St Pierre,J., Lin,J., Krauss,S., Tarr,P.T., Yang,R., Newgard,C.B., and Spiegelman,B.M. (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 26597-26603.

Sugioka,R., Shimizu,S., and Tsujimoto,Y. (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.* ...

Suske,G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* *238*, 291-300.

Szabadkai,G., Simoni,A.M., Chami,M., Wieckowski,M.R., Youle,R.J., and Rizzuto,R. (2004c). Drp-1-Dependent Division of the Mitochondrial Network Blocks Intraorganellar Ca(2+) Waves and Protects against Ca(2+)-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* *16*, 59-68.

Szabadkai,G., Simoni,A.M., Chami,M., Wieckowski,M.R., Youle,R.J., and Rizzuto,R. (2004a). Drp-1-Dependent Division of the Mitochondrial Network Blocks Intraorganellar Ca(2+) Waves and Protects against Ca(2+)-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* *16*, 59-68.

Szabadkai,G., Simoni,A.M., Chami,M., Wieckowski,M.R., Youle,R.J., and Rizzuto,R. (2004b). Drp-1-Dependent Division of the Mitochondrial Network Blocks Intraorganellar Ca(2+) Waves and Protects against Ca(2+)-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* *16*, 59-68.

Tanaka,T., Yamamoto,J., Iwasaki,S., Asaba,H., Hamura,H., Ikeda,Y., Watanabe,M., Magoori,K., Ioka,R.X., Tachibana,K., Watanabe,Y., Uchiyama,Y., Sumi,K., Iguchi,H., Ito,S., Doi,T., Hamakubo,T., Naito,M., Auwerx,J., Yanagisawa,M., Kodama,T., and Sakai,J. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 15924-15929.

Thompson,C.C., Brown,T.A., and McKnight,S.L. (1991). Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science* *253*, 762-768.

## Introducción

- Tiranti,V., Savoia,A., Forti,F., D'Apollito,M.F., Centra,M., Rocchi,M., and Zeviani,M. (1997). Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum. Mol. Genet.* 6, 615-625.
- Vila,M. and Przedborski,S. (2003). Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 365-375.
- Virbasius,C.A., Virbasius,J.V., and Scarpulla,R.C. (1993a). NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev.* 7, 2431-2445.
- Virbasius,J.V., Virbasius,C.A., and Scarpulla,R.C. (1993b). Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.* 7, 380-392.
- Vogel,J.L. and Kristie,T.M. (2000). The novel coactivator C1 (HCF) coordinates multiprotein enhancer formation and mediates transcription activation by GABP. *EMBO J.* 19, 683-690.
- Wallberg,A.E., Yamamura,S., Malik,S., Spiegelman,B.M., and Roeder,R.G. (2003). Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha. *Mol. Cell* 12, 1137-1149.
- Wan,B. and Moreadith,R.W. (1995). Structural characterization and regulatory element analysis of the heart isoform of cytochrome c oxidase VIa. *J. Biol. Chem.* 270, 26433-26440.
- Wang,X. (2001b). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15, 2922-2933.
- Wang,X. (2001a). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15, 2922-2933.
- Wang,Y.X., Lee,C.H., Tiep,S., Yu,R.T., Ham,J., Kang,H., and Evans,R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113, 159-170.
- Wei,M.C., Zong,W.X., Cheng,E.H., Lindsten,T., Panoutsakopoulou,V., Ross,A.J., Roth,K.A., MacGregor,G.R., Thompson,C.B., and Korsmeyer,S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
- Williams,R.S. (1986). Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J. Biol. Chem.* 261, 12390-12394.
- Winder,W.W., Holmes,B.F., Rubink,D.S., Jensen,E.B., Chen,M., and Holloszy,J.O. (2000). Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* 88, 2219-2226.
- Wolzt,M., MacAllister,R.J., Davis,D., Feelisch,M., Moncada,S., Vallance,P., and Hobbs,A.J. (1999). Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin. Mechanisms underlying synthesis, no release, and biological activity. *J. Biol. Chem.* 274, 28983-28990.
- Wong,E.D., Wagner,J.A., Gorsich,S.W., McCaffery,J.M., Shaw,J.M., and 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.
- Wrutniak,C., Cassar-Malek,I., Marchal,S., Rasclé,A., Heusser,S., Keller,J.M., Flechon,J., Dauca,M., Samarut,J., and Ghysdael,J. (1995). A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J. Biol. Chem.* 270, 16347-16354.

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

Wu,H., Kanatous,S.B., Thurmond,F.A., Gallardo,T., Isotani,E., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (2002a). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296, 349-352.

Wu,H., Kanatous,S.B., Thurmond,F.A., Gallardo,T., Isotani,E., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (2002b). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296, 349-352.

Wu,H., Kanatous,S.B., Thurmond,F.A., Gallardo,T., Isotani,E., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (2002c). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296, 349-352.

Wu,H., Kanatous,S.B., Thurmond,F.A., Gallardo,T., Isotani,E., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (2002d). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296, 349-352.

Wu,H., Kanatous,S.B., Thurmond,F.A., Gallardo,T., Isotani,E., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (2002e). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296, 349-352.

Wu,H., Naya,F.J., McKinsey,T.A., Mercer,B., Shelton,J.M., Chin,E.R., Simard,A.R., Michel,R.N., Bassel-Duby,R., Olson,E.N., and Williams,R.S. (2000). MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J.* 19, 1963-1973.

Wu,H., Rothermel,B., Kanatous,S., Rosenberg,P., Naya,F.J., Shelton,J.M., Hutcheson,K.A., DiMaio,J.M., Olson,E.N., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (2001). Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J.* 20, 6414-6423.

Wu,Z., Puigserver,P., Andersson,U., Zhang,C., Adelmant,G., Mootha,V., Troy,A., Cinti,S., Lowell,B., Scarpulla,R.C., and Spiegelman,B.M. (1999a). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.

Wu,Z., Puigserver,P., Andersson,U., Zhang,C., Adelmant,G., Mootha,V., Troy,A., Cinti,S., Lowell,B., Scarpulla,R.C., and Spiegelman,B.M. (1999b). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.

Xia,Y., Buja,L.M., and McMillin,J.B. (1998). Activation of the cytochrome c gene by electrical stimulation in neonatal rat cardiac myocytes. Role of NRF-1 and c-Jun. *J. Biol. Chem.* 273, 12593-12598.

Xia,Y., Buja,L.M., Scarpulla,R.C., and McMillin,J.B. (1997). Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 11399-11404.

Yoon,J.C., Puigserver,P., Chen,G., Donovan,J., Wu,Z., Rhee,J., Adelmant,G., Stafford,J., Kahn,C.R., Granner,D.K., Newgard,C.B., and Spiegelman,B.M. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413, 131-138.

Yoon,J.C., Xu,G., Deeney,J.T., Yang,S.N., Rhee,J., Puigserver,P., Levens,A.R., Yang,R., Zhang,C.Y., Lowell,B.B., Berggren,P.O., Newgard,C.B., Bonner-Weir,S., Weir,G., and Spiegelman,B.M. (2003). Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. *Dev. Cell* 5, 73-83.

Zamzami,N., Marchetti,P., Castedo,M., Decaudin,D., Macho,A., Hirsch,T., Susin,S.A., Petit,P.X., Mignotte,B., and Kroemer,G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane

## **Introducción**

potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* **182**, 367-377.

Zong,H., Ren,J.M., Young,L.H., Pypaert,M., Mu,J., Birnbaum,M.J., and Shulman,G.I. (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 15983-15987.

Zuchner,S., Mersiyanova,I.V., Muglia,M., Bissar-Tadmouri,N., Rochelle,J., Dadali,E.L., Zappia,M., Nelis,E., Patitucci,A., Senderek,J., Parman,Y., Evgrafov,O., Jonghe,P.D., Takahashi,Y., Tsuji,S., Pericak-Vance,M.A., Quattrone,A., Battaloglu,E., Polyakov,A.V., Timmerman,V., Schroder,J.M., Vance,J.M., and Battaloglu,E. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* **36**, 449-451.

## **1 Modelos animales y toma de muestras.**

El modelo animal elegido en esta tesis ha sido la cepa Wistar de *Rattus Norvegicus*. Las ratas se adquirieron en Interfauna S.A., y fueron mantenidas por el servicio de estabulación de la Facultad de Biología. Se alimentaron *ad libitum* con pienso de los laboratorios Purina. Las condiciones de estabulación han sido las habituales: temperatura de 22 °C y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas.

### **1.1 Tratamiento con el agonista específico $\beta$ 3-AR CL-316243.**

#### **1.1.1 Tratamiento agudo.**

A las ratas macho se les inyectó intraperitonealmente una dosis de CL-316243 (1 mg/kg). A las 24 h fueron anestesiados con pentobarbital (200 mg/kg) y se extrajo el tejido adiposo marrón (TAM), el músculo gastrocnemius. Las muestras extraídas se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

#### **1.1.2 Tratamiento crónico.**

Ratas macho fueron anestesiadas (con flujo controlado de isofluorano) y operadas por el Dr Luc Martí para implantar una minibomba osmótica que suministraba el compuesto CL-316243 a 1 mg/kg\*día. Al cabo de siete días fueron anestesiados con pentobarbital (200 mg/kg) y se extrajo el TAM y el músculo gastrocnemius. Las muestras extraídas se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.



## **1.2 Exposición al frío.**

Ratas macho fueron expuestas al 4 °C durante 48h, a continuación fueron anestesiados con pentobarbital (200 mg/kg) y se extrajo el TAM y el músculo gastrocnemius. Las muestras extraídas se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

## **2 Cultivos celulares.**

### **2.1 Condiciones generales.**

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

### **2.2 Medios y técnicas generales.**

Las líneas celulares utilizadas han sido básicamente fibroblastos y mioblastos. Como sus requerimientos son similares, se han usado los mismos medios y técnicas en todos los casos, salvo que se especifique lo contrario.

### 2.2.1 Medios y reactivos generales

- Soluciones generales:
  - Medio DMEM de BioWhittaker (con 4,5 g/l de glucosa, con glutamina)
  - Suero bovino fetal (FBS) de Gibco BRL. Previamente a su utilización se inactiva calentándolo a 56 °C durante 30 minutos. El suero inactivado (FBS inactivado) se alicuota en tubos estériles de 50 ml y se guarda a -20 °C o bien a 4 °C si se va a utilizar inmediatamente.
  - Penicilina/Estreptomicina (BioWhittaker o Gibco BRL) 10.000 U/ml:10.000 µg/ml.
  - HEPES 1,25 M pH 7,4; filtrado a través de filtros 0,22 µm y guardado a -20 °C.
  - Tripsina (Gibco BRL).
  - Tri-yodotironina (T3). Para experimentos de transfección con receptores de hormona tiroidea, éstos se activaban añadiendo hormona tiroidea T3 al medio de cultivo. La tri-yodotironina se compró a Sigma (cat # T-2752), y se añadió a una concentración final de 50-100 nM. Se prepara un stock a 50 µM, disolviendo 1,7 mg de T3 en 1 ml de NaOH 0,05 M, y añadiendo esta disolución sobre 50 ml de medio completo al 2% deplecionado de hormona tiroidea (ver apartado 2.2.2). Esta disolución se filtra para esterilizarla y se alicuota y guarda a -20 °C, protegida de la luz. Estos pasos de disolución se realizan porque la T3 resulta difícil de disolver directamente en el medio.
  
- Preparación de medios y reactivos:
  - Medios completos: Sobre un volumen de 500 ml de medio DMEM se añaden los siguientes reactivos a la concentración final indicada:
    - HEPES 25 mM (dilución 1/50 del *stock*). Esto proporciona un sistema adicional de tamponamiento del medio además del que proporciona el incubador de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>).
    - Penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (dilución 1:100 del *stock*).

## **Materiales y Métodos**

- Suero bovino fetal inactivado. Se añade al 10% (v/v) para el medio de crecimiento y al 2% (v/v) para el medio de diferenciación.

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

### **2.2.2 Medio completo deplecionado de hormona tiroidea.**

En algunos experimentos de transfección nos interesaba disponer de un medio libre de hormonas tiroideas, para observar más claramente el posible efecto del T3 añadido externamente. Estos medios, tanto de crecimiento (FBS 10%), como de diferenciación (FBS 2%), se preparan del mismo modo que los medios completos vistos en el apartado anterior (2.2.1), con la única salvedad de que el suero utilizado se depleciona previamente de hormona tiroidea. La depleción se consigue mediante el tratamiento del suero con la resina de intercambio iónico AG 1-X8 (BioRad, 200-400). El protocolo de depleción de suero es el siguiente:

1. Se pesan 10 g de resina y se lavan tres veces consecutivas con 30 ml de agua estéril.
2. La resina se recoge por centrifugación a 1.500 g durante 5 minutos después de cada lavado, y se decanta el sobrenadante.
3. Esta resina lavada se añade sobre 200 ml de FBS inactivado en una botella de 250 ml.
4. La suspensión de resina se agita vigorosamente durante 4 horas a temperatura ambiente en un agitador.
5. El suero se separa de la resina por centrifugación en una botella de centrifuga Nalgene de 250 ml (20 minutos a 2.000 rpm en un rotor Sorvall GSA). Recogemos el sobrenadante y lo transferimos a una nueva botella.
6. El sobrenadante se trata de nuevo con 10 g de resina fresca, esta vez durante toda la noche, y se separa de nuevo por centrifugación.

7. El proceso se repite de nuevo con 10 g de resina fresca, esta vez durante 4 horas más.
8. Se toma este último sobrenadante, que ya es el suero deplecionado de hormona tiroidea, y se esteriliza por filtración a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Se alicuota en tubos estériles de polipropileno de 50 ml y las alícuotas se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3. Técnicas generales.

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

#### A) Descongelación de células.

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

1. Se descongela rápidamente el vial (criotubo) a  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. Se añade el contenido del vial a un tubo de centrifuga de 15 ml con 5-10 ml de medio completo.
3. Se centrifuga a 1.200 rpm (260 g) durante 4 minutos.
4. Se elimina el sobrenadante. Estos últimos 3 pasos sirven para eliminar los restos de DMSO (crioprotector) que hay en el medio de congelación (ver apartado C).
5. Resuspendemos el *pellet* en un volumen adecuado de medio completo (5-10 ml).
6. Se siembra la resuspensión en un frasco, o placa, de superficie adecuada. Si el cultivo es reciente y se espera una alta viabilidad de las células se puede sembrar en un frasco de  $75\text{ cm}^2$ ; si, por el contrario, se trata de un cultivo congelado hace mucho tiempo es conveniente sembrarlo en una placa de  $3,5\text{ cm}^2$  de diámetro o en un frasco de  $25\text{ cm}^2$ . Esperamos que las células lleguen a un 75-80% de confluencia

## **Materiales y Métodos**

y procedemos según los protocolos de mantenimiento de la línea celular (ver apartado B).

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

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

1. Se aspira el medio en que las células están creciendo.
2. Se lavan con PBS (unos 10 ml). Se procura no verter con fuerza el líquido sobre las células para no arrancarlas del frasco. El EDTA presente en esta solución secuestra los iones Ca<sup>2+</sup> necesarios para el mantenimiento de la adhesión celular al sustrato.
3. Se añade 1 ml de tripsina . Cuando se han utilizado frascos o placas de superficie diferente, este volumen se ha variado proporcionalmente.
4. Se agita suavemente el frasco o placa para repartir la tripsina. Cuando las células se despegan, y si hay un alto grado de confluencia, puede verse a simple vista una masa blanquinosa flotando en el líquido que son las células despegadas. Se puede también comprobar al microscopio que efectivamente hemos conseguido despegar las células de la superficie de plástico. Conviene no prolongar el tiempo de exposición de las células a la tripsina, ya que esta proteasa puede llegar a digerir las proteínas de la superficie celular (receptores, transportadores,...) y comprometer su viabilidad.
5. Se añaden 10 ml de medio o DMEM completo (proporción 1:10 del volumen de proteasa añadido) para diluir la tripsina.
6. Se cuenta una alícuota en una cámara de Neubauer.

7. Se diluyen las células hasta una concentración adecuada según las necesidades. Por ejemplo: si queremos amplificar un cultivo de células 10T1/2 sembraremos del orden de 400.000 células por frasco de 75 cm<sup>2</sup>.
8. Se siembra el volumen de células correspondiente en la placa o el frasco.

### C) Congelación de células.

Los cultivos celulares se pueden mantener durante largo tiempo congelados en nitrógeno líquido. Es conveniente mantener *stocks* de células congeladas de un número bajo de pases de mantenimiento, ya que los cultivos tienden a envejecer y a perder sus características bioquímicas y morfológicas con las subdivisiones y sucesivos tratamientos con tripsina. Además conviene tener cultivos congelados en previsión de posibles contaminaciones en el cultivo con el que se está trabajando. El protocolo utilizado para la congelación es el siguiente:

1. Se recupera el cultivo en crecimiento por tripsinización como se explica en el apartado B.
2. Se vuelve a centrifugar a 1.200 rpm (260 g) durante 4 minutos.
3. Se resuspenden las células en una solución de DMSO (Sigma, cat. D-2650) diluido al 10% en FBS a una concentración de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml. El DMSO actúa de crioprotector; a pesar de ello debe evitarse una exposición prolongada de las células a este producto a temperatura ambiente ya que resulta tóxico.
4. Se alicuota esta suspensión en volúmenes de 1 ml en criotubos de 1.8 ml (previamente colocados en hielo), indicando el número de procesos de tripsinización que ha sufrido el cultivo, la cantidad de células congeladas, el tipo celular y la fecha de congelación.
5. Se almacena inmediatamente a -80°C y al día siguiente se pasa al tanque de nitrógeno líquido. Alternativamente se puede congelar a -20°C y al cabo de unas horas pasarlo a -80°C y al día siguiente pasarlo a nitrógeno líquido, en un proceso de congelación progresiva menos dañino para las células.

## **Materiales y Métodos**

6. Una vez que el vial está congelado se puede conservar durante semanas a  $-80^{\circ}\text{C}$  o bien se conserva en el tanque de  $\text{N}_2$  líquido durante períodos más largos.

### **2.3 Líneas celulares utilizadas.**

#### **2.3.1 Línea fibroblástica C3H10T1/2.**

La línea de fibroblastos de ratón C3H10T1/2 ( en adelante 10T1/2) se compró a la ATCC (American Type Culture Collection, cat. CCL-226, lot F-13396) y se mantuvieron siguiendo las condiciones generales de cultivo.

#### **2.3.2 Línea miogénica L6E9.**

La línea celular L6E9 fue subclonada a partir de la línea L6 por el Dr. Nadal-Ginard (Nadal-Ginard, 1978). El Dr. Nadal-Ginard (Universidad de Harvard, USA) nos donó amablemente esta línea. La línea celular L6 fue establecida por Yaffe (Yaffe, 1968) a partir de un cultivo primario de músculo esquelético de la pata de neonatos de rata, transformado mediante la adición de metilcolantreno. Del mismo modo que las células que provienen de cultivos primarios, esta línea celular consiste en mioblastos mononucleados con capacidad de diferenciar a miotubos multinucleados de forma espontánea.

La línea celular L6E9 se mantiene en estado proliferativo en medios ricos en suero (10% de suero bovino fetal) y presenta una morfología fusiforme. En condiciones de menor cantidad de suero (2% de FBS) y alta confluencia celular se induce su diferenciación: los mioblastos salen del ciclo celular, se alinean y finalmente se fusionan formando miotubos multinucleados alargados y ramificados. Estos cambios morfológicos van acompañados de cambios bioquímicos como por ejemplo la expresión de genes correspondientes al fenotipo de músculo diferenciado y la represión de la expresión de genes correspondientes al fenotipo de mioblasto (Nadal-Ginard, 1978). Los miotubos formados tienen una vida de aproximadamente 7 días.

### **2.3.3 Células HeLa.**

Esta línea se obtuvo de la ATCC (cat. CCL-2) y se mantuvieron siguiendo las condiciones generales de cultivo. Son células epiteliales de adenocarcinoma de cérvix.

### **2.3.4 Células 293.**

Las células 293 son células de riñón embrionario humano que fueron originariamente transformadas con DNA procedente de adenovirus de tipo 5 (Ad5) por el Dr. Graham (Graham et al., 1977). Estas células contienen y expresan la región E1 (*early region 1*) del Ad5 y por tanto permiten el crecimiento de adenovirus deficientes en E1. Se han utilizado para la propagación y titulación de adenovirus recombinantes. Se obtuvieron de la ATCC (cat. CRL-1573) y se mantuvieron siguiendo las condiciones generales de cultivo.

### **2.3.5 10T1/2 antisentido de Mfn2.**

Las 10T1/2 transfectadas establemente con una secuencia de 300 bp complementaria al mRNA de Mfn2 así como las antisentido control transfectadas con el vector de expresión vacío fueron producidas en nuestro laboratorio por el Dr. Bach (Bach et al., 2003). Esta línea antisentido posee unos niveles de expresión de mRNA y proteína de Mfn2 de un 70% menor que las 10T1/2 control. Las condiciones de cultivo son las mismas que las de las 10T1/2.

## **3 Técnicas generales de manipulación del DNA.**

El trabajo con DNA y bacterias implica la utilización de material esterilizado para evitar contaminaciones con DNAsas, con otras bacterias y con DNA ajeno. La manipulación de bacterias se ha realizado siempre en las proximidades de un mechero Bunsen que nos



## **Materiales y Métodos**

proporciona un área estéril de trabajo. El material fue autoclavado a 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos para esterilizarlo e inactivar las DNAsas que pudiera haber. Los reactivos utilizados eran de calidad para Biología Molecular y el agua empleada para prepararlos de calidad ultrapura (sistema Milli-Q de Millipore). El pH de las soluciones se ajustó antes de ser esterilizadas mediante autoclavado o filtración (filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  Ø de poro).

### **3.1 Bacterias competentes.**

Para mantener y amplificar los plásmidos, éstos han sido transformados en las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y XLBlue desarrolladas por Stratagene. La preparación de las bacterias competentes fue realizado por los técnicos contratados por el laboratorio.

#### **3.1.1 Transformación.**

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

1. A 100  $\mu\text{l}$  de bacterias competentes añadimos el DNA que queremos transformar. Para transformar plásmidos se utilizan cantidades inferiores a 50 ng. Para productos de ligación hemos añadido 1/2 o todo el volumen de la reacción de ligación (entre 5 y 10  $\mu\text{l}$ ).
2. Lo mezclamos y lo mantenemos en hielo durante 30 minutos. Esto permite la adsorción del DNA a la superficie de la bacteria.
3. Lo incubamos a 42 °C durante 90 segundos.
4. Añadimos 1 ml de medio LB y lo incubamos a 37 °C durante 1 h. Agitamos ocasionalmente los tubos. Durante este tiempo las bacterias que han incorporado el plásmido expresan la resistencia al antibiótico que permite su selección.

5. . Concentramos el cultivo por centrifugación en un tubo eppendorf a velocidad máxima durante 2 minutos.

### **3.2 Recuperación del DNA.**

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

#### **3.2.1 Miniprep.**

En esta tesis se han utilizado para preparación de todo tipo de DNA plasmídico kits comerciales de la casa Qiagen siguiendo las instrucciones del proveedor, en este caso QIAprep Miniprep, basado en el método de lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979). Este método consiste en lo siguiente: (1) lisis alcalina de las bacterias, (2) precipitación de las proteínas y del genoma bacteriano, y (3) purificación del plásmido mediante una resina que provee el mismo *kit*. Materiales, reactivos y soluciones.

#### **3.2.2 Maxiprep.**

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

### **3.3 Análisis del DNA por restricción.**

La digestión del DNA se ha llevado a cabo siguiendo las instrucciones de los proveedores y utilizando los tampones suministrados con los enzimas. Se recomienda una relación de una

## **Materiales y Métodos**

unidad enzimática por  $\mu\text{g}$  de DNA y una digestión de una hora a la temperatura óptima del enzima. No obstante, por lo general hemos utilizado concentraciones más elevadas de enzima para optimizar la digestión (2-4 U/ $\mu\text{g}$ ). En ningún caso se ha superado un volumen de enzima superior al del 10% del volumen final de reacción, dado que la solución de enzima suele contener glicerol al 50% como crioprotector, y concentraciones de glicerol superiores al 10% pueden inhibir la reacción enzimática.

### **3.4 Electroforesis en gel de agarosa.**

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

#### **A) Soluciones.**

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

#### **B) Preparación del gel y las muestras.**

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

### **C) Preparación del Gel.**

1. Pesamos 0,5 g de agarosa y añadimos 50 ml de TAE x1 en un erlenmeyer de 150-200 ml (gel al 1% de agarosa). Marcamos el volumen de la solución.
2. Fundimos la agarosa en un microondas y lo dejamos enfriar a temperatura ambiente. Añadimos agua destilada por compensar las pérdidas por evaporación (hasta la marca anterior).
3. Preparamos el soporte del gel sellando los extremos y colocando el peine (molde para los pozos).
4. Cuando el erlenmeyer se puede tocar sin que queme (aprox. 40°C) se añade el bromuro de etidio. Se mezcla bien y se vierte dentro del soporte sellado y con el peine (molde por los pozos) preparado.
5. Cuando el gel es sólido quitamos el peine y lo colocamos en la cubeta de electroforesis.
6. Cubrimos el gel con tampón TAE x1.

### **D) Preparación de las muestras.**

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

Se carga cada muestra en un pozo del gel, se conectan los electrodos a la fuente de electroforesis y se corre el gel a un voltaje constante de 70-90 voltios. El DNA, con carga negativa, migra al polo positivo. El resultado de la electroforesis se comprueba en un

## **Materiales y Métodos**

transiluminador de rayos UV. Disponíamos de un sistema de obtención de imágenes para obtener fotografías de los geles. En los casos en que el DNA se quería recuperar del gel se ha evitado una exposición prolongada a los rayos UV que pudiera producir daños al DNA.

### **3.5 Recuperación de fragmentos de DNA (de geles de agarosa).**

Los fragmentos separados en un gel de agarosa se pueden recuperar para utilizarlos en una ligación, para obtener sondas marcadas o para otras finalidades. Durante la realización de esta tesis se ha utilizado el *kit* comercial de la casa Amersham-Biosciences *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (cat. 27-9602-01) siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **3.6 Ligación.**

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

#### **A) Procedimiento**

1. Se mezclan los fragmentos que se van a ligar procurando mantener una relación molar inserto/vector de 3 a 1 y que la cantidad total de DNA sea de aproximadamente 100 ng. El volumen de la reacción suele ser de 10 µl. Se añade 1 µl de tampón de ligación 10X y 1 µl de T4 ligasa (New England Biolabs, cat M0202S).
2. Se incuba a 4°C durante 16-18 horas.

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

### 3.7 PCR.

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) consiste en la amplificación de un fragmento de DNA a partir de DNA molde. La enzima responsable de esta amplificación es la DNA polimerasa. En esta tesis se han utilizado dos polimerasas diferentes: la *Taq DNA polymerase* (Roche, cat. 1430-000), que no tiene actividad exonucleasa; y la *Expand High Fidelity Taq polymerase* (Roche, cat1732650), que presenta actividad exonucleasa 3'→5' i se utiliza para amplificar fragmentos de cDNA que es imprescindible una elevada fiabilidad de secuencia. Las cantidades de enzima, tampón, DNA molde, dNTPs y *primers* se debe poner a punto para cada pareja de *primers*.

### 3.8 Mutagénesis dirigida.

Se ha utilizado el *kit* de mutagénesis *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* de STRATAGENE (cat. 200516), que permite la obtención rápida de plásmidos mutantes partiendo de DNA de cadena doble evitando así el paso previo de obtención de DNA de cadena sencilla necesario en otros protocolos de mutagénesis. El método se basa en la amplificación del DNA por PCR con la *Pfu* DNA polimerasa, a partir de dos oligonucleótidos complementarios que contienen la mutación que se quiere introducir. Una vez finalizada la amplificación, el producto se trata con la enzima de restricción Dpn I, que sólo corta el DNA que está metilado, de manera que sólo las cadenas sintetizadas *in vitro* serán resistentes a la acción de esta enzima. Después se transforma este DNA en bacterias *E. coli* competentes y se analizan por restricción (si se ha introducido o elimina

## **Materiales y Métodos**

una diana de restricción con la mutación) o secuenciación los clones obtenidos. En todas las mutaciones realizadas se ha seguido las instrucciones del *kit*.

### **3.9 Secuenciación.**

La comprobación definitiva de una ligación complicada u otra alteración de la secuencia de DNA, así como la confirmación de una secuencia de nucleótidos, requiere la utilización de un sistema de secuenciación. Con este objeto hemos utilizado el equipo *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). Consiste en una reacción de PCR donde se incluyen dideoxinucleótidos fluorescentes que paran la polimerización y permiten su identificación. Se han seguido las instrucciones del proveedor.

Todas las reacciones de secuenciación han sido analizadas por los servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona.

## **4 Amplificación *FirstChoice™ RACE-Ready cDNA*.**

Esta técnica nos permite amplificar un cDNA de nuestro interés asegurándonos de incorporar el extremo 5' del cDNA. Utilizamos el kit de Ambion *FirstChoice™ RACE-Ready cDNA* de músculo esquelético humano (cat. 3264). La característica del cDNA que se incluye en el kit está en que en una primera fase el RNA del *kit* es enriquecido con mRNA a través de 3 rondas de selección con oligo dT. El RNA es tratado a continuación con fosfatasa intestinal de ternero (CIP, de *calf intestinal phosphatase*) que elimina todos los 5'-fosfatos de moléculas como rRNA, mRNA fragmentado y tRNA. La caperuza de los extremos 5' intactos del mRNA no es afectada por la CIP. El RNA se trata entonces con la fosfatasa ácida del tabaco (TAP) que elimina la caperuza dejando un monofosfato a 5'. Un oligonucleótido sintético se adapta en el extremo 5' de los RNAs mediante la T4 RNA ligasa. El oligonucleótido no se puede unir a los otros RNA porque estas moléculas no tienen el fosfato a 5' necesario para la reacción. Se realiza seguidamente una reacción de

transcriptasa reversa usando *primers* al azar para obtener el cDNA. Finalmente el cDNA se trata con RNAsa para eliminar el RNA y por cromatografía de exclusión molecular se seleccionan todos aquellos cDNAs mayores de 200 nucleótidos.

El *kit* proporciona dos *primers* que anillan con el adaptador sintético. Con estos dos *primers* y dos *primers* específicos de *Mfn2* humana se realiza una *nested* PCR.

Los *primers* específicos de *Mfn2* utilizados anillan en el segundo exón y las condiciones de la *nested* PCR han sido las aconsejadas por el fabricante.

Los productos de la PCR son visualizados en un gel de agarosa al 2% mediante tinción con bromuro de etidio.

Para determina el origen de transcripción, los fragmentos de PCR son clonados en un plásmido tipo pGEM-T easy (PROMEGA, cat 1360) y los clones positivos secuenciados.

## 5 TRANSFECCIÓN CELULAR TRANSITORIA.

El análisis de la funcionalidad de una proteína o bien de la actividad transcripcional de una región promotora de un gen requiere de las técnicas de transfección. En la realización de esta tesis se han utilizado básicamente dos métodos: transfección mediante fosfato cálcico (Wigler *et al.*, 1979) y transfección mediante el reactivo comercial *FuGENE 6 Transfection Reagent* de Roche (cat. 1814443).

### 5.1 Plásmidos utilizados.

Todos los plásmidos empleados en experimentos de transfección fueron purificados mediante la utilización de kits comerciales de la empresa Qiagen para mini-, maxipreps. Una descripción de los plásmidos utilizados se puede encontrar en el anexo.



## **5.2 Métodos de transfección transitoria.**

### **5.2.1 Método del fosfato cálcico.**

Este método se basa en la introducción de un coprecipitado de fosfato cálcico y DNA exógeno en la célula. El precipitado se adhiere inicialmente a la superficie de la célula y posteriormente es endocitado. El precipitado se forma al mezclar dos soluciones; una salina que contiene cloruro cálcico y otra tamponada que contiene el fosfato (HBS); el DNA presente queda incorporado al precipitado que se forma.

El parámetro más importante en la formación correcta del precipitado es el pH de la solución de fosfatos HBS: pequeñas variaciones en el pH dan lugar a la formación de un precipitado demasiado grueso para permitir la endocitosis del DNA, o bien de un precipitado demasiado pequeño que no sedimenta sobre las células y por ello disminuye mucho la eficiencia de transfección. En cualquier caso se recomienda comprobar la eficiencia de transfección con soluciones de diferentes pH (dentro del rango teóricamente óptimo de entre 6,9 y 7,2) con plásmidos que expresen proteínas fácilmente monitorizables (como por ejemplo *green fluorescent protein* GFP). Otro parámetro importante en la formación del precipitado es la cantidad de DNA. Se recomienda el uso de entre 15-20 µg de DNA total por cada placa de 10 cm de diámetro. Para conseguir estas cantidades se añade a los DNA de interés un DNA *carrier* (en nuestro caso siempre fue el plásmido pBluescript 2 KS<sup>+</sup>) para completar la cantidad total indicada.

La eficiencia de transfección entre diferentes puntos experimentales puede variar debido a problemas metodológicos difíciles de controlar. Para corregir estas variaciones se cotransfecta cada condición con una misma cantidad de un plásmido que expresa constitutivamente GFP. La valoración de GFP en los extractos citoplasmáticos de las células transfectadas permite cuantificar la eficiencia de transfección de cada punto y corregir las variaciones provocadas por factores metodológicos.

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

Este método fue utilizado para transfectar las células HeLa obteniendo eficiencias de transfección en esta línea celular del 80-100%.

### A) Soluciones y reactivos.

- HBS 2x (0,28 M NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).
- Se ajusta al pH que da un precipitado óptimo (entre 6.9-7,2) con NaOH. Se esteriliza por filtración, se alícuota y se conserva a -20°C. Una vez descongelada una alícuota se mantiene a 4°C. Esta solución se puede obtener por dilución 1/10 de una solución *stock* 10 veces más concentrada (HBS 20x) o por posterior ajuste del pH.
- Solución de CaCl<sub>2</sub> (2 M CaCl<sub>2</sub>; 0,1 M Tris-base).
- Se ajusta el pH a 7,2 con HCl, se filtra y se conserva a 4°C. Las alícuotas que no se utilizan se pueden conservar a -20°C.
- DNA carrier (pBluescript 2 KS-)
- Vector GFP
- Plásmidos a transfectar
- Medio completo (10%FBS)
- Agua bidestilada esterilizada por filtración, se conserva a 4°C. Las alícuotas que no están en uso se pueden guardar a -20°C.

### B) Procedimiento.

Todas las operaciones se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad necesarias para evitar contaminaciones del cultivo celular.

1. Se siembran suficientes flascos de 75 cm<sup>2</sup> unos días antes de la transfección de modo que dispongamos de suficientes células para el experimento. Es conveniente que las células se encuentren a un 20% de confluencia el día de la transfección.

## **Materiales y Métodos**

2. Se atemperan las soluciones necesarias a temperatura ambiente. Se prepara la mezcla de DNA que se quiere transfectar en tubos estériles de 15 ml en un volumen de 0.5ml.
3. Se añaden a la mezcla de DNA 0.5 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub>.
4. Se añaden 1 ml de HBS x2 a un nuevo tubo de 15 ml estéril y transparente. Se añade la mezcla de DNA-CaCl<sub>2</sub> sobre el HBS gota a gota mientras se mezcla con un vórtex a baja velocidad. Al acabar de añadir toda la solución se mantiene el vórtex a máxima velocidad (con el tubo tapado) durante 5 segundos. Se deja reposar la mezcla durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Después de la incubación de 15 minutos repartimos la mezcla de precipitado y células a cada placa (2 ml por placa). Repartimos bien las células agitando las placas con un movimiento en cruz y las dejamos en el incubador de células durante 6-18 horas (normalmente las dejábamos 16-18 horas, durante la noche).
6. Después de la incubación aspiramos el medio con el precipitado no incorporado y lavamos las células dos veces con PBS x1. Una excesiva exposición de las células al precipitado puede comprometer su viabilidad.
7. Añadimos 10 ml de medio completo fresco y dejamos las placas en el incubador durante 48-72 horas para permitir la expresión de los plásmidos transfectados.

### **5.2.2 Transfección con el reactivo comercial FUGENE™.**

Este método de transfección comercializado por Roche está basado en una mezcla de lípidos no liposomales que permiten introducir eficientemente DNA exógeno en células eucarióticas. Su ventaja principal es que permite reducir el número de células y la cantidad de DNA necesarios para la transfección y por tanto aumentar el número de puntos experimentales por transfección, además de ofrecer un protocolo experimental de mayor rapidez. Por estos motivos, la mayor parte de las transfecciones transitorias realizadas en esta tesis doctoral se han llevado a cabo utilizando este sistema siguiendo las instrucciones de la casa comercial, la relación  $\mu\text{g DNA} : \mu\text{l FuGene}$ , ha sido de 1: 2,5.

## 6 Análisis de la actividad transcripcional.

El análisis de la actividad transcripcional de genes reportero se llevó a cabo típicamente a las 40 horas después de la transfección utilizando la actividad del enzima reportero Luciferasa.

### 6.1 Ensayo de actividad luciferasa.

Los estudios llevados a cabo en esta tesis han utilizado como gen reportero la enzima luciferasa de la luciérnaga. La presencia de esta enzima es detectable en extractos de células transfectadas gracias a su bioluminiscencia: la reacción catalizada por la luciferasa transforma la luciferina en oxiluciferina en presencia de ATP,  $Mg^{2+}$  y  $O_2$ , y produce además fotones de luz visible. Para la detección de actividad luciferasa en esos ensayos se utilizó el kit comercial *Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System* de Promega (cat. E1910), y se siguieron básicamente las instrucciones del fabricante. Con este sistema podemos preparar extractos citoplasmáticos de células transfectadas, y analizar la actividad de la luciferasa en un luminómetro. Como control de transfección de estos experimentos se utiliza la cotransfección de la luciferasa *Renilla*, que transforma la coelenterazina en coelenteramida, también con producción de luz. En el kit se dispensa el material necesario para poder detectar la actividad luciferasa y *Renilla* a partir de un mismo extracto citoplasmático. Si se ha cotransfectado el plásmido reportero con vectores de expresión de factores de transcripción el sistema utilizado era el *Luciferase<sup>®</sup> Assay System* (cat. E4030), dado que el factor de transcripción sobreexpresado puede actuar sobre el promotor del CMV que dirige la expresión de la *Renilla* y la normalización de la eficiencia de transfección por la *Renilla* no es posible. En este caso la eficiencia de transfección se determina cotransfectando con GFP y midiendo en el FACS el porcentaje de células que

## **Materiales y Métodos**

expresan GFP. Asumimos que las células transfectadas con GFP también lo están con los otros plásmidos

### **A) Preparación de extractos.**

Los extractos se preparan con un tampón de lisis que en nuestro caso se utilizó únicamente para placas multi-well de 24 pocillos, 100 µl por pocillo.

### **B) Soluciones y Reactivos.**

- PBS x1.
- Tampón de lisis pasiva x5 (Passive Lysis Buffer, PLB, kit Promega).
- Agua bidestilada.

### **C) Procedimiento.**

1. Eliminamos por decantación el medio de cultivo de las placas. Lavamos 2 veces las placas con PBSx1 de forma cuidadosa para evitar arrancar las células.
2. Añadir el tampón de lisis PLB x1 (diluido añadiendo 4 volúmenes de agua a 1 volumen de PLB x5) necesario para cubrir el pocillo, 100 µl.
3. Situamos la placa en una plataforma rotatoria y agitar suavemente durante 15-30 minutos.
4. Se transfiere el lisado a un tubo eppendorf limpio. Este lisado crudo está listo para leer la actividad luciferasa, pero para otras determinaciones de proteína posteriores es conveniente aclarar el lisado centrifugando durante 30 segundos en una microfuga a máxima velocidad y pasando el lisado a un tubo fresco.

## 6.2 Ensayo de la Actividad Dual Luciferasa/Renilla.

### A) Reactivos y Materiales.

- Reactivo para ensayo de luciferasa: (Luciferase Assay Reagent II; LAR II)
- Reactivo de ensayo *Renilla*: (Stop&Glo<sup>®</sup> Reagent)
- Luminómetro
- Extractos celulares.

### B) Procedimiento.

1. En un luminómetro Turner TD-20/20 se ceban los inyectores 1 y 2 con reactivo de luciferasa LAR 2 y reactivo de *Renilla* Stop&Glo<sup>®</sup>, respectivamente.
2. Preparamos un número suficiente de tubos de polipropileno adecuados para el luminómetro, según el número de muestras a ensayar.
3. Se añaden entre 2 y 20  $\mu$ l del primer extracto citoplasmático a un tubo y se coloca en el luminómetro. Éste habrá sido programado previamente para inyectar secuencialmente 50  $\mu$ l del reactivo LAR II, esperar unos segundos, leer durante un tiempo prefijado, inyectar 50  $\mu$ l de reactivo Stop & Glo<sup>®</sup> y esperar y leer de nuevo durante unos segundos prefijados. Los datos se imprimen también de manera automática.

Después de cada lectura se descarta el contenido y el tubo y se procede con el siguiente. Si la lectura está fuera de rango, el usuario puede modificar tanto la cantidad de extracto a añadir (entre 2 y 20  $\mu$ l), como la sensibilidad del luminómetro (por lo general fijada en un 60%) o bien el tiempo de espera antes de cada lectura (entre 5 y 15 segundos) o el tiempo de integración durante el cual se captan las unidades relativas de luz (entre 5 y 15 segundos).

## **7 Infección con adenovirus.**

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

En esta tesis se ha utilizado un adenovirus recombinante bicistrónico, que codifica para PGC-1 $\alpha$  y para GFP, lo que permite monitorizarlo fácilmente. El adenovirus fue cedido generosamente por el Dr. Puigserver (Dana-Farber Cancer Institute Boston, USA.).

### **7.1 Amplificación de Adenovirus.**

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

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

#### **B) Procedimiento.**

1. Se parte de 5 placas de 15 cm de  $\varnothing$  de células 293 con una confluencia de aproximadamente el 80%.
2. Se saca el medio al 10% de suero.
3. Se añade 5 ml DMEM al 2% por medio al 2% de suero.
4. Se añaden los adenovirus con aproximadamente 1-2 partículas víricas por célula (MOI 1-2).

5. Se deja al incubador durante 1,5 horas, preferiblemente en ligera agitación.
6. Se sube el volumen a 25 ml con DEMEM al 10%.
7. Al cabo de 36-48 horas se debe producir el efecto citopático. En tal caso los adenovirus están listos para ser recogidos. Si el efecto citopático se produce antes de 24 horas se debe posiblemente a un efecto tóxico de las proteínas virales y no a la amplificación de los adenovirus.

## 7.2 Purificación de adenovirus.

La purificación de los adenovirus se ha realizado utilizando el *kit BD Adeno-X<sup>TM</sup> Virus Purification Kit* (BD Biosciences, cat 631533) siguiendo las instrucciones del fabricante. Básicamente consiste en pasar el medio por un filtro que retiene a los adenovirus, recoger las células y lisarlas mediante tres ciclos de congelación descongelación y pasar el sobrenadante del lisado por el filtro. Finalmente tras unos lavados del filtro con el tampón de lavado suministrado por el fabricante eluir los virus en un volumen pequeño (2-4 ml). La ventaja que ofrece el *kit* respecto al método manual es que en este último la recolección de células se debía hacer al inicio del efecto citopático antes de la lisis celular, pero con el *kit* esto no es limitante pues el filtro es capaz de retener las partículas víricas del medio. Dado que en el *kit* se puede recolectar los virus una vez finalizado el efecto citopático se parte de un número menor de placas (5 contra 30 del método manual).

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

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



## **Materiales y Métodos**

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

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

### **B) Procedimiento.**

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

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

## 7.4 Protocolo de infección.

### A) Soluciones y reactivos.

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

### B) Procedimiento.

1. Se induce la diferenciación de las células L6E9 en placa de 10 cm Ø. Las 10T1/2 se crecen en placa de 10 cm (obtención de proteína) o *multiwell* de 6 (ensayos de  $\Psi$ ).
2. Las L6E9 se infectan al tercer día de diferenciación y las 10T1/2 cuando se hallan en una confluencia del 90%.
3. Las células se incuban durante 1-2 horas en un volumen bajo de DMEM sin suelo con un número de unidades infectivas de 200 y 500 en el caso de las L6E9 o de 100 en el de las 10T1/2.
4. Pasadas las 1-2 horas se sube le volumen de medio con suero y se devuelven las placas al incubador hasta el momento en que se utilizan para los distintos protocolos. Para la obtención de RNA durante 48 horas y para la obtención de proteína o los ensayos de  $\Psi$  72 horas.

## 8 Obtención de mitocondrias y proteínas mitocondriales.

### 8.1 Aislamiento de mitocondrias de tejido de rata.

No existe un protocolo común para el aislamiento de mitocondrias de tejidos y células. Aunque se sigue el mismo esquema: preparación de un homogenado seguido de una centrifugación diferencial y , si es necesario, centrifugación por gradiente de densidad. Las características intrínsecas de las células o de los tejidos y la finalidad experimental de las

## **Materiales y Métodos**

mitocondrias aisladas determinan la selección del homogeneizador, la composición del tampón, los niveles aceptables de contaminantes etc., es por eso, que un buen aislamiento de mitocondrias requiere conocer la naturaleza de las células o el tejido con los que se va a trabajar. Los protocolos de aislamiento de mitocondrias de tejidos y células fue puesto a punto en nuestro laboratorio por la Dra. Pich.

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

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

### **A) Materiales y reactivos.**

- Músculos de ratas winstar soleus y EDL.
- TAMPÓN I (0,1 M KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7,4; 5 mM EGTA; 5 mM pirofosfato sódico pH 6,8; Inhibidores de proteasas Papstatina A 2 μM, PMSF 0.5 mM, Aprotinina 1U/ml).
- TAMPÓN II (0,25 M sacarosa; 50 mM KCl; 5 mM EDTA; 1 mM pirofosfato sódico; 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7,4; Inhibidores de proteasas Papstatina A 2 μM, PMSF 0.5 mM, Aprotinina 1U/ml).

Estos tampones se preparan el día del experimento y se mantienen en hielo durante todo el proceso.

- Politrón CPCU.

- Homogenizador (tipus *tight-fitting glass-Teflon homogenizer*).
- Centrífuga Sorvall (rotor SA600) o Microfuga (dependiendo de los gramos de tejido de partida) atemperadas a 4°C.

## **B) Procedimiento.**

1. Se pesan los tejidos y se sumergen en el tampón I a 4 °C unos 20 minutos. Cambiando el tampón por uno fresco a los 10 minutos. Este tipo de tampón contribuye a evitar la contaminación con miofibrillas que se podría dar después del proceso de homogeneización y que dificultaría las posteriores etapas de centrifugación diferencial.
2. Los tejidos se sumergen en tampón II en una placa petri que se coloca sobre una superficie horizontal en hielo y se cortan en pequeños trozos de aproximadamente 3 mm<sup>3</sup>.
3. Los pedazos de músculo son primero disgregados mediante la acción mecánica del politrón (1400 rpm). La relación volumen del tampón: masa del tejido es de 10:1. El proceso se realiza a 4 °C.
4. Los trozos de tejido son homogenados, 10-12 veces con un homegenizador de vidrio y un émbolo de teflón conectado a un motor que proporciona una fuerza de 1400 rpm. El proceso se realiza a 4 °C. Antes de proceder a las etapas de centrifugación diferencial se separan aproximadamente 100 µl del homogenado obtenido (fracción H) para posteriores análisis.
5. El homogenado se centrifuga a 1300 g durante 10 minutos a 4 °C. Se guarda el sobrenadante (SN1) y el precipitado se resuspende en tampón II y se vuelve a centrifugar a 1300 g durante 10 minutos a 4 °C.
6. El segundo sobrenadante obtenido (SN2) se junta con el SN1 y se centrifuga a 9000 g durante 15 minutos a 4 °C. El precipitado es la fracción mitocondrial (MT).
7. La MT se resuspende en un volumen de aproximadamente 5 veces el del precipitado y se repite la centrifugación a 9000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante

## **Materiales y Métodos**

obtenido se descarta y el precipitado final (que contiene las proteínas mitocondriales) se resuspende con una pipeta automática. Durante todo el proceso las fracciones se mantienen en hielo.

8. Se realiza una valoración de proteínas (apartado 11). Se alicuotan las fracciones y se conservan a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **8.2 Solubilización de miofibrillas.**

Los tejidos musculares presentan gran abundancia de miofibrillas. Las mitocondrias además de distribuirse en las zonas subsarcolemas de las fibras musculares, frecuentemente, se acumulan entre las miofibrillas lo que puede dificultar el proceso de obtención de mitocondrias.

Es aconsejable solubilizar las miofibrillas de músculo esquelético antes de proceder a la centrifugación diferencial para la obtención de mitocondrias.

#### **A) Materiales y reactivos.**

- 4 M KCl.
- 0,1 M Pirofosfato sódico.
- Homogenado de músculo esquelético.
- Tampón de solubilización (0,6 M KCl; 15mM Pirofosfato sódico pH 6,8).
- Microultracentrífuga Beckman atemperada a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Tubos eppendorf Beckman para microultracentrífuga.
- Rotor RP100-AT4 de ultracentrifugación de ángulo fijo.

#### **B) Procedimiento.**

1. Al homogenado de músculo esquelético se le añade KCl hasta una concentración final de 15 mM.

2. Se solubiliza durante 1 hora en agitación a 4 °C.
3. Se centrifuga la muestra a 45.000 rpm durante 1 hora a 4 °C en una microultracentrífuga.
4. Se descarta el sobrenadante y el precipitado obtenido se resuspenden en tampón II (vean 8.1 A) y se procede a la obtención de mitocondrias.

### 8.3 Aislamiento de mitocondrias procedentes de cultivos celulares.

El protocolo para extraer mitocondrias de células es esencialmente el mismo que para obtener mitocondrias de tejidos, pero con algunas modificaciones.

#### A) Materiales y reactivos.

- Tampón de homogeneización (0,25 M sacarosa; 1 mM EGTA; 10 mM HEPES-NaOH pH 7,4; Inhibidores de proteasas Papstatina A 2 µM, PMSF 0.5 mM, Aprotinina 1U/ml). Este tampón se prepara el mismo día del experimento y se mantiene en hielo durante todo el proceso.
- Placas de células en cultivo. 2 placas de 10 cm de Ø o 1 placa de 15 cm de Ø.
- *scraper* de plástico para desadherir las células de la superficie de la placa
- PBS, pH 7,4.
- Homogenizador (tipo *tight-fitting glass-Teflon homogenizer*).
- Microfuga atemperada a 4°C. Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Microultracentrífuga Beckman. Tubos eppendorf de 1,5 ml para ultracentrífuga (Beckman, #357448), atemperada a 4°C. Rotor RP100-AT4

#### B) Procedimiento.

## Materiales y Métodos

1. Se parte de 2 placas de 10 cm de  $\varnothing$  o de una placa de 15 cm de  $\varnothing$  con células en estado de confluencia.
2. Se colocan las placas sobre una superficie horizontal en gel, se aspira el medio de cultivo de las placas y las células se lavan 2 veces en PBS.
3. Se elimina el PBS y se congelan las placas rápidamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  si la extracción de mitocondrias no se realiza el mismo día.
4. Se añaden de 500 $\mu\text{l}$ -1ml de tampón de homogenización frío con inhibidores de proteasas y se desadhieren las células de la placa con la ayuda de un *scraper*. El volumen de tampón depende de la confluencia de las células: se añade 1 ml de tampón en el caso de que las placas estén a una confluencia del 100% y 500  $\mu\text{l}$  si están a un 50%.
5. Se recoge la suspensión obtenida en un homogenizador de vidrio en hielo y se homogeniza el lisado de células 10 veces con un émbolo de teflón conectado a un motor (distancia del émbolo al homogenizador de vidrio: 0,13-0,18 mm).
6. Recogemos el homogenado en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se separan  $\sim 100$   $\mu\text{l}$  para posteriores análisis, y se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se guarda el sobrenadante en gel, el precipitado obtenido se resuspende en un volumen de aproximadamente 700  $\mu\text{l}$  de tampón de homogenización y se repite la misma etapa de centrifugación a 1500 g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
7. Se descarta el sobrenadante y el precipitado obtenido se resuspende en  $\sim 200$   $\mu\text{l}$  de tampón de homogenización (el volumen de resuspensión variará dependiendo del tamaño del precipitado).

(Después de aplicar repetidamente este protocolo en las líneas celulares estudiadas se ha observado que a 1500 g sedimentan las mitocondrias más pesadas y mayoritarias. Se ha utilizado esta fracción como fracción mitocondrial).

8. Si se continúa el proceso de centrifugación diferencial, el sobrenadante de la centrifugación de 1500 g se centrifuga a 10.000 g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado obtenido se resuspende en 150  $\mu\text{l}$  de tampón de homogenización y contendrá las mitocondrias más ligeras que no hayan precipitado en la centrifugación anterior.

9. Se realiza una valoración de proteínas (apartado 12). Se alicuotan las fracciones y se conservan a -80 °C.

## 9 Obtención de extractos nucleares.

### 9.1 Obtención de núcleos.

Para realizar los ensayos de retardo en gel o *band-shift* se requiere la obtención de núcleos purificados en las mejores condiciones funcionales posibles, por lo que se requieren protocolos adecuados para este fin. Los protocolos de obtención de núcleos a partir de cultivo celular seguidos en esta tesis son una adaptación de los protocolos estándar.

#### A) Soluciones y reactivos.

- Tampón hipotónico (10 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 0,2 mM de PMSF\* ; 0,5 mM de DTT\*).

\*Estos reactivos se añaden inmediatamente antes de su utilización.

- Solución de azul de tripán (0,4 g de azul de tripán (0,81 g NaCl; 0,66 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se disuelve hirviéndose en agua, se deja enfriar, se ajusta el pH a 7,2-7,3 con NaOH y se lleva a 100 ml con ddH<sub>2</sub>O).

#### B) Procedimiento.

1. Se necesitan entre 5 y 10 placas de 15 cm Ø de cultivo celular.
2. Se aspira el medio y se lava dos veces con 10 ml de PBS frío. Se recuperan las células rascando dos veces con un *scraper* y añadiendo 5 ml de PBS cada vez. Las células se recogen en tubos de centrifuga de 50 ml (el contenido de 5 placas por cada tubo de centrifuga).



## **Materiales y Métodos**

3. Se centrifuga la suspensión de células a 4°C a 2.600 g (3.000 rpm en una centrífuga SORVALL RC3B) durante 10 minutos.
4. Se descarta el sobrenadante y se mide el volumen del *pellet* celular (pcv). Se resuspende en 5x pcv volúmenes de PBS. El pcv suele oscilar entre 400-600 µl.
5. Se centrifuga a 4°C y 3.000 rpm durante 10 minutos.
6. Se resuspende el pellet celular en 5x pcv volúmenes de tampón hipotónico. Este paso se realiza lo más rápido posible para evitar una lisis celular prematura.
7. Se vuelve a centrifugar a 4°C y 3.000 rpm durante 10 minutos.
8. Se resuspende en 3x pcv volúmenes de tampón hipotónico y se incuba a 4°C durante 10 minutos.
9. Se transfiere la suspensión a un homogeneizador Potter-Elvehjem de 5 ml y se rompen las células bajando el émbolo 10 veces.
10. Se comprueba la lisis mezclando 10 µl de homogenado, 40 µl de tampón hipotónico y 10 µl de solución de azul de tripán y observando esta preparación en un microscopio. Los núcleos aparecen teñidos por el colorante indicando que la membrana celular impermeable al colorante se ha roto. La lisis tiene que ser superior al 95%.
11. Se transfiere el homogenado a un tubo de centrífuga de 15 ml y se precipitan los núcleos centrifugando a 2900 g a 4°C durante 20 minutos.
12. Se descarta el sobrenadante y se procede a la extracción de proteína nuclear.

### **9.2 Obtención de Extractos Nucleares puros.**

Partiendo de núcleos purificados se extraen las proteínas nucleares incrementando la osmolaridad y la fuerza iónica de la suspensión de núcleos, añadiendo KCl. Los núcleos se contraen y liberan las proteínas solubles que contienen. Las proteínas unidas al DNA como los factores de transcripción se despegan en estas condiciones de fuerza iónica, y se pueden recuperar en el extracto nuclear. Este protocolo se lleva a cabo inmediatamente a continuación de la purificación de núcleos y debe hacerse lo más rápido posible para evitar

una pérdida de las actividades de unión al DNA de los factores de transcripción presentes en el extracto.

#### A) Soluciones.

- Tampón de baja concentración de sal (*Low salt buffer*) (20 mM HEPES pH 7,9; 25% glicerol; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM de PMSF\*; 0,5 mM de DTT\*).
- Tampón de alta concentración de sal (*High salt buffer*) (20 mM HEPES pH 7,9; 25% glicerol; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,2 M KCl; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM de PMSF\*; 0,5 mM de DTT\*).
- Tampón de diálisis (20 mM HEPES pH 7; 20% glicerol; 100 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM de PMSF\*; 0,5 mM de DTT\*).

\*Estos reactivos se añaden inmediatamente antes de utilizar la solución.

#### B) Procedimiento.

1. Al final del protocolo de aislamiento de núcleos se mide el volumen ocupado por el precipitado de núcleos (pnv del inglés *packed nuclear volume*). Se resuspenden éstos en la mitad del volumen del pnv con tampón de baja concentración de sal (*low salt buffer*). El pnv suele ser de unos 150-250 µl.
2. Añadimos poco a poco tampón de alta concentración de sal (*high salt buffer*) hasta la mitad del volumen del pnv. Generalmente se va añadiendo el volumen de este tampón en fracciones de 1/10. Al añadir cada fracción se mezcla la suspensión con una pipeta para evitar concentraciones locales de sal demasiado elevadas que podrían colapsar los núcleos y liberar la cromatina.
3. Colocamos el tubo de microcentrífuga en un agitador orbital y lo incubamos durante 30 minutos para permitir la extracción de las proteínas nucleares. En este paso los núcleos se contraen y liberan su contenido proteico.

## **Materiales y Métodos**

4. Se centrifuga la suspensión en una microcentrífuga a máxima velocidad durante 30 minutos para separar los núcleos del extracto.
5. Recuperamos el sobrenadante y lo introducimos en una bolsa de diálisis (Sigma cat.# D-9277), previamente lavada con agua destilada. Colocamos la bolsa de diálisis con el extracto en un vaso de precipitados que contiene 50 ml de tampón de diálisis a 4°C (relación mínima de 50:1 entre el volumen del tampón y el del extracto crudo). Se deja durante 30 minutos en agitación a 4°C.
6. Se recupera el extracto dializado en un tubo de microcentrífuga y se centrifuga a máxima velocidad durante 30 minutos a 4°C para separar los restos de núcleos contaminantes y precipitar el DNA que pueda haber.
7. Se alicuota el sobrenadante (suele ser de unos 100-200 µl) en alícuotas de 10-30 µl en tubos de microcentrífuga que se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido. Los extractos se conservan a -80°C durante meses aunque las actividades de unión al DNA van disminuyendo con el tiempo y los ciclos de congelación-descongelación de cada alícuota.

### **9.3 Obtención de extractos nucleares crudos.**

Este protocolo (Bhavsar et al., 2000) comparándolo con el procedimiento anterior nos permite obtener extractos nucleares en menos tiempo y el material de partida se reduce considerablemente.

El protocolo consiste en tripsinizar las células, lavarlas y romperlas con un detergente que lisa la membrana citoplasmática mientras que la nuclear permanece intacta. Como paso final, los núcleos se tratan con una solución de alta concentración de sales con lo que se colapsan los núcleos y los extractos nucleares se liberan.

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

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

- Tampón de baja concentración de sales (tampón A) (10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA).
- Tampón de alta concentración de sales (tampón C) (20 mM HEPES pH 7,9; 0,4 mM NaCl; 1 mM EDTA).

Inmediatamente antes de utilizarse estos tampones se añade: 1mM de DTT; 0,5 mMPMSF; 10 µg/ml de aprotinina; 10 µg/ml de leupeptina.

- Solución al 10 % de NP-40.
- Tripsina.
- Suero fetal bovino (FBS).
- PBS (X1).

### **B) Procedimiento.**

1. Se extrae el medio de las placas y se lava dos veces con PBS 1x frío.
2. Se tripsiniza.
3. Se añade 400 µl de FNBS para inactivar la tripsina. Se transfieren las células en suspensión de la placa a un eppendorf de 1,5 ml.
4. Se centrifugan un minuto a 4 °C a 11000 g.
5. El precipitado se resuspende en 1 ml de PBS frío
6. Se repite el apartado 4.
7. El precipitado se resuspende en 400 µl de solución A fría. La resuspensión se realiza gota a gota y dando pequeños golpes con el dedo a la parte inferior del eppendorf.
8. Se deja el tubo en hielo durante 15-30 minutos invirtiendo cada 5-10 minutos el tubo para que las células no precipiten.
9. Se añade 25 µl de NP-40 al 10% (concentración final 0,625 %) y rápidamente se invierte el tubo varias veces. No se debe permitir que las células estén en contacto

## **Materiales y Métodos**

con el NP-40 mucho tiempo, por ello se recomienda que este paso se realice junto a una centrifuga.

10. Se centrifugan un minuto a 4 °C a 11000 g.
11. El precipitado (núcleos) se resuspenden en 50 µl de solución C fría. Igual que con la solución A, se ha de hacer gota a gota.
12. Se deja el tubo en hielo durante 15-30 minutos para que los núcleos colapsen. Con cierta frecuencia se le dan unos golpecitos a la parte inferior del tubo para facilitar la extracción de los extractos nucleares.
13. Se centrifuga durante 15 minutos a 11000 g a 4 °C.
14. El sobrenadante se pasa a un tubo nuevo y se conserva a -80 °C.

## **10 Retardo en gel.**

El ensayo de retardo en gel (EMSA por “*electrophoretic mobility shift assay*”, también llamado *gel-shift*, o *band-shift*) permite detectar y caracterizar *in vitro* la interacción proteína-DNA, por lo cual es una valiosa herramienta en el estudio de factores de transcripción. Consiste en la incubación de extractos nucleares con una sonda marcada radiactivamente, correspondiente a la región de interés del promotor que se estudia, en unas condiciones adecuadas de unión. Esta incubación se corre en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante: la movilidad de la sonda es menor si una parte de ésta ha interactuado con proteínas nucleares. Para disminuir las interacciones inespecíficas se añade un oligonucleótido irrelevante no marcado (normalmente polidI-dC; en ocasiones polidG-dC). La unión específica se verifica con la adición de un exceso de sonda no marcada (o una secuencia de DNA que contiene los elementos de unión para los factores que estamos estudiando) que compite con la sonda marcada en la unión de los factores de transcripción.

## 10.1 Obtención y marcaje de las sondas.

### 10.1.1 Anillamiento y marcaje de oligonucleótidos sintéticos.

Este método es muy útil para la obtención de sondas pequeñas (15-30 pb) marcadas. Los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia directa y reversa de la sonda fueron sintetizados por TIB MOLBIOL. Estos oligonucleótidos son anillados y marcados con la T4 polinucleótido-quinasa o por *fill-in* si el anillamiento de los oligonucleótidos deja un extremo protuberante a 5'.

#### A) Reactivos y equipamiento.

- Oligonucleótidos sintéticos.
- ddH<sub>2</sub>O estéril.
- Termomixer.

#### B) Procedimiento.

1. Se resuspenden los oligonucleótidos liofilizados en TE o ddH<sub>2</sub>O estéril para obtener una concentración de 100 pmol/μl (se conserva a -20°C).
2. Se mezclan volúmenes iguales de cada oligonucleótido (20 μl de cada uno) en un tubo de microcentrífuga y se incuba a 85 °C durante 5 minutos.
3. Se baja la temperatura del termomixer a 65 °C y se deja durante 15 minutos.
4. Se baja la temperatura del termomixer a 37 °C y se deja durante 15 minutos.
5. Se deja el tubo con los oligonucleótidos a temperatura ambiente durante 15 minutos más.
6. Finalmente se deja el tubo en hielo durante 5 minutos.
7. La reacción de anillamiento se puede comprobar en un gel de agarosa al 3%, cargando un volumen igual de reacción (DNA de doble cadena) y de los

## **Materiales y Métodos**

oligonucleótidos individuales. Corremos el gel a un voltaje bajo y poco tiempo hasta que el azul de bromofenol entre en el gel. Los oligonucleótidos anillados aparecen más brillantes porque el DNA de doble cadena tiene más afinidad por el bromuro de etidio que el DNA de cadena sencilla, puesto que este compuesto se intercala en la estructura de la doble hélice. Además, si el gel se corre más tiempo la movilidad también es diferente; mayor para los oligonucleótidos desanillados.

8. Los oligonucleótidos anillados se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Su concentración es la mitad de la de los oligonucleótidos originales sin anillar:  $50\text{ pmol}/\mu\text{l}$ .

### **10.1.2 Marcaje de los oligonucleótidos de doble cadena por *fill-in*.**

Este método se utiliza cuando uno de los oligonucleótidos es una o unas pocas bases más corto que el otro de modo que al anillarse se generan extremos 5' protuberantes con al menos una G. La incubación con la klenow y  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$  rellena el extremo 5' protuberante incorporando la C radiactiva.

#### **A) Reactivos y materiales.**

- 200 ng de oligonucleótidos de cadena doble.
- Klenow (Roche, cat. 1 008 404 .2U/ $\mu\text{l}$ ).
- 10 x tampón Klenow (suministrado con el enzima).
- $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$  (Amersham). 3.000 Ci/mmol. Cat. AA005.
- ddH<sub>2</sub>O estéril.
- Columnas de filtración en gel G-25 (MicroSpin<sup>TM</sup>, Amersham).

#### **B) Procedimiento.**

1. Mezclamos en un tubo eppendorf:
  - 200 ng de oligonucleotido sintético.
  - 5  $\mu$ l de tampón Klenow 10x.
  - 5  $\mu$ l de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP.
  - Hasta 48  $\mu$ l de agua estéril.
  - 2  $\mu$ l de Klenow.
2. Lo incubamos a 37°C durante 30 minutos.

### 10.1.3 Separación de nucleótidos no incorporados.

Para separar la sonda marcada de las moléculas de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP no incorporadas hemos utilizado minicolumnas de filtración en gel que permiten separar los oligonucleótidos no incorporados de las moléculas de DNA marcadas, si éstas tienen al menos 10 bp de longitud (MicroSpin™ G-25 Columns, Amersham Pharmacia, Cat 27-5325-01). El protocolo de utilización ha sido el indicado por el fabricante.

### 10.1.4 Marcaje de los oligonucleotidos de doble cadena por la T4 polinucleótido-quinasa.

Este método aprovecha la actividad de la T4-polinucleótido-quinasa que permite la transferencia del grupo fosfato en posición  $\gamma$  al extremo 5' del DNA.

#### A) Reactivos y Materiales

- 20 pmoles de oligonucleótidos de cadena doble (generalmente a partir de una solución madre de 5 pmols/ $\mu$ l).
- T4 Polinucleótido-quinasa (Promega, cat.# M-4101, 10 U/ $\mu$ l).
- 10 x tampón T4 Polinucleótido-quinasa (suministrado con el enzima).



## Materiales y Métodos

- $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP Redivue (Amersham, cat.# AA0018).
- EDTA 0,5 M.
- ddH<sub>2</sub>O estéril.
- Columnas de filtración en gel G-25 (MicroSpin™, Amersham Pharmacia).

## B) Procedimiento.

1. Mezclamos en un tubo de microcentrífuga:
  - a. 4  $\mu$ l de la solución madre de oligonucleótidos 5  $\mu$ M (5pmols/ $\mu$ l).
  - b. 2 $\mu$ l de tampón T4 Polinucleótido quinasa 10x.
  - c. 5  $\mu$ l de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP Redivue.
  - d. 7  $\mu$ l de agua estéril.
  - e. 2 $\mu$ l de T4 Polinucleótido quinasa.
2. Lo incubamos a 37°C durante 1 hora.
3. Paramos la reacción añadiendo 1  $\mu$ l de EDTA 0,5 M.
4. Se separa el oligonucleótido marcado de los nucleótidos no incorporados con la columna G-25 como se describe en el apartado anterior.

## 10.2 Ensayo de retardo en gel.

### 10.2.1 Preparación del sistema de electroforesis.

En primero lugar preparamos el gel no desnaturalizante que nos permitirá separar la sonda libre y los complejos de retardo. La reacción de unión se llevará a cabo a continuación (apartado 10.2.2). La concentración de la mezcla acrilamida:bis-acrilamida (29:1) utilizada depende de la medida de la sonda y de la migración de los complejos que se quieran detectar. Para ensayos con sondas pequeñas (15-30 pb) el porcentaje suele ser del 7%, para

sondas más largas (más de 100 pb) o ensayos de *super-shift* el porcentaje utilizado es del 4%.

#### A) Reactivos y Soluciones.

- Solución al 30% de acrilamida (Serva). Disuelta en agua bidestilada y filtrada. Se conserva a 4°C protegida de la luz.
- Solución al 2% de Bis-N,-methylene-bis-acrylamide (BioRad). Disuelta en agua bidestilada y filtrada. Se conserva a 4°C protegida de la luz.
- Solución de acrilamida-bisacrilamida.
- TEMED (BioRad).
- Persulfato amónico al 10% (APS).
- Tampón TBE x5 (0,45 mM Tris-HCl; 0,45 mM ácido bórico; 10 mM EDTA pH 8).

#### B) Procedimiento.

1. Utilizamos el sistema de electroforesis HSI. Lavamos con etanol los dos cristales del sistema, especialmente las caras que estarán en contacto con el gel. Tomamos dos separadores y un peine de 0,75 mm de grosor. Montamos el sistema siguiendo las especificaciones del proveedor poniendo a veces grasa lubricante de rotor en la parte inferior de los cristales para evitar pérdidas de la solución de poliacrilamida.
2. Preparamos por un lado tampón TBE 0,5x diluyendo en agua destilada, y por otra 40 ml de gel en un vaso de precipitados de cristal según las fórmulas siguientes:
  - Gel de poliacrilamida al 4%: 5,2 ml Acrilamida al 30%; 2 ml de solución de Bis-acrilamida al 2%; 4 ml de tampón TBE 5x; 180 µl APS al 10%; 28,6 ml ddH<sub>2</sub>O.
  - Gel de poliacrilamida al 7%: 9,1 ml Acrilamida al 30%; 3,2 ml de solución de Bis-acrilamida al 2%; 4 ml de tampón TBE 5x; 180 µl APS al 10%; 23,2 ml ddH<sub>2</sub>O.

## Materiales y Métodos

3. Añadimos 15  $\mu$ l de TEMED. Lo mezclamos e inmediatamente lo vertemos entre los dos cristales. Cuando la solución llega a la parte superior de los vidrios colocamos el peine (normalmente utilizamos uno de 15 pozos) y dejamos que polimerice durante al menos 30 minutos. El gel puede utilizarse a continuación o bien puede guardarse a 4°C cubierto con Parafilm para evitar que se seque.

### 10.2.2 Reacción de unión al DNA.

La reacción de unión de las proteínas nucleares del extracto al DNA se realiza en tampón de diálisis (apartado 9.2) diluido 1/2. Se incluye una condición control con la sonda sin extracto proteico para tener una referencia de la movilidad de la sonda libre en el gel no desnaturizante, y otra donde se carga un tampón marcador que contiene azul de bromofenol y xilen cianol, que servirán por monitorizar la electroforesis.

#### A) Soluciones y reactivos.

- Tampón de diálisis (se guarda a 4°C, sin PMSF, ni DTT)
- Muestra en la que se quiere detectar la presencia de proteínas que se unen al DNA: extractos nucleares, producto de transcripción y traducción *in vitro*, proteínas recombinantes:
- Poli dI-dC (Sigma cat.# P4929, 10 unidades de absorbancia). Se prepara una solución estoc disolviendo el vial en 600  $\mu$ l de agua estéril (0,8  $\mu$ g/ $\mu$ l). Se guarda en alícuotas de 30  $\mu$ l a -20 °C.
- Sonda de DNA marcada.
- PMSF 0,1 M. Disuelto en isopropanol.
- 0,1 M DTT.
- Oligonucleótidos no marcados para utilizar como competidores.
- Tampón marcador de electroforesis (Formamida al 95%; 20 mM EDTA; 0,05% azul de bromofenol; 0.5% xilen cianol).

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis para realizar *band-shift* son:

MEF2: 5'-ATT TTT GTA TTT TTA GTA CAG-3'

MEF2mut: 5'-ATT TTT GGA TCC TTA GTA CAG-3'

MEF2Glut4: 5'-CGT GGG AGC TAA AAA TAG CCA -3'

ERR: 5'-TTT CCT CAA AGG CGA CTG AAG GGC AG-3'

ERRmut: 5'-TTT CCT CAT ATG CGA CTG AAG GGC AG-3'

## B) Procedimiento.

1. Precorrer el gel a 100 V durante al menos 1 h antes de cargar las muestras. Se utiliza tampón TBE 0,5x en la electroforesis. Se lavan los pozos inyectando tampón con una pipeta para eliminar los restos de material del gel que puedan quedar y que podrían interferir posteriormente con la muestra.
2. Se escribe una tabla con la composición de cada tubo de reacción. Como la mezcla es complicada y puede incorporar diferentes condiciones es necesario que sea clara. El volumen final tiene que ser tan pequeño como sea posible (hasta 20  $\mu$ l, usualmente entre 10 y 15  $\mu$ l). El glicerol presente en el tampón de diálisis (20%) de las muestras proporciona la densidad necesaria porque la muestra baje hasta el fondo del pozo en el momento de cargarla, pero concentraciones superiores al 12% pueden inhibir la interacción proteína-DNA. Así pues, añadiremos tampón de diálisis para igualar los volúmenes necesarios de muestra entre los diferentes puntos hasta la mitad del volumen final. El resto del volumen está compuesto por soluciones acuosas que diluyen el glicerol (solución de poli-dIdC, sonda, competidores, anticuerpos si los hay y H<sub>2</sub>O).
3. Preparamos 1 ml de tampón de diálisis completando la solución de *stock* con 1  $\mu$ l de la solución de *stock* de PMSF y 5 $\mu$ l de la solución *stock* de DTT. Descongelamos los competidores específicos, las alícuotas necesarias de poli-dI-dC y los extractos nucleares. Estas soluciones se mantienen en hielo.
4. Preparamos las mezclas de reacción en un tubo eppendorf siguiendo el esquema preparado y añadiremos en este orden: agua bidestilada, tampón de diálisis,

## **Materiales y Métodos**

competidor específico (si es necesario y en un exceso molar de 50-200 veces), extracto proteico (normalmente entre 5 y 10  $\mu\text{g}$ ) y 1  $\mu\text{l}$  de la solución *stock* de poli-dIdC.

5. Centrifugamos durante unos 5 segundos en una microcentrífuga.
6. Preincubamos la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, descongelamos la sonda marcada.
7. Añadimos unas 15.000 cpm de sonda a cada tubo y los incubamos en hielo durante 20 minutos. Paramos el precorrido del gel y lo preparamos por cargar las reacciones.
8. Cargamos las muestras.
9. Corremos el gel a 150 V hasta que el azul de bromofenol haya recorrido unas 3/4 partes de la longitud del gel (comprobamos su migración relativa según la concentración de poliacrilamida del gel y la medida de la sonda que utilizamos). Desmontamos el sistema rápidamente por evitar la difusión de las bandas y separamos el gel de los cristales. Recuperamos el gel con un adhiriéndolo a un papel Whatman de una medida algo superior a la del gel y lo cubrimos con papel de plástico.
10. Secamos el gel (secador de geles BioRad Gel Drier), con el secador precalentado a 80°C. El gel se suele secar en unos 40-50 minutos.
11. Exponemos el gel en un film.

### **10.2.3 Reacción de unión al DNA en presencia de anticuerpos (*super-shift*).**

Consiste en un protocolo de retardo en gel donde se añade un anticuerpo que reconoce específicamente a una de las proteínas que se pueden unir a la sonda. Si el factor de transcripción que se une a la sonda de DNA es reconocido por el anticuerpo se genera un complejo de mayor peso molecular que presentará por tanto un mayor retardo en el gel. Generalmente se añade un carril de control al cual no se añade muestra, pero sí sonda y anticuerpo para descartar posibles interacciones entre el anticuerpo y la sonda.

En esta tesis se ha utilizado un anticuerpo policlonal contra MEF2A amablemente cedido por la Dr. Mora (University of Iowa, U.S.A) y como control un anticuerpo policlonal

irrelevante generado en conejo, como el anticuerpo contra MEF2A. Se utilizó 1 µl de cada uno de ellos por reacción.

## **B) Procedimiento.**

Se sigue el mismo procedimiento que en el ensayo de retardo en gel pero teniendo en cuenta que en el momento de preparar la mezcla de reacción el volumen de anticuerpo que se añadirá posteriormente. Una vez se ha incubado la mezcla de reacción con la sonda marcada durante 20 minutos en hielo, se añade el anticuerpo correspondiente (normalmente 1 µl) y se incuba durante 30 minutos más en hielo. Las muestras a las que no se añade anticuerpo o proteína se incuban paralelamente durante estos 30 minutos. A continuación se cargan las muestras y se procede según el protocolo de retardo en gel anterior.

## **11 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).**

La ChIP es una técnica que permite estudiar interacciones DNA/proteína *in vivo*. En este método células intactas son fijadas mediante formaldehído, para mantener la interacción DNA/proteína. A continuación las células son lisadas y el DNA fragmentado por sonicación en pequeños fragmentos de 200 a 1000 pb. El complejo DNA/proteína es inmunoprecipitado con un anticuerpo específico de la proteína de interés para a continuación romper el *crosslinking*. Las proteínas son eliminadas por tratamiento con proteasa K y el DNA purificado. El DNA es analizado por PCR para saber si la proteína se une a la región del DNA de interés. La técnica de la ChIP es de gran utilidad dado que la unión DNA/proteína en el contexto cromosómico depende de diversos factores como la topología cromosómica y los efectos reguladores de diversos factores de transcripción y coactivadores.

## **11.1 Fragmentación de la cromatina.**

La fragmentación de la cromatina por sonicación en fragmentos entre 200-1000 bp es un paso decisivo para el éxito de la ChIP. Antes de empezar el protocolo de la ChIP se debe poner a punto para cada tipo celular las condiciones de sonicación.

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

- Placa de 10 cm de Ø de células HeLa.
- PBS frío.
- Formaldehído al 37%.
- Glicina 1,25 M.
- *Scrapers*.
- Plataforma agitadora.
- Sonicador IKA U200Scontrol.
- Tampón de lisis (1% SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,1)
- NaCl 5M.
- EDTA 0,5 M.
- Tris-HCl 1 M pH 6,5.
- Proteinasa K (10 mg/ml).
- Microcentrífuga atemperada a 4 °C.
- Equipo de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

A los tampones se le añade antes de empezar inhibidores de proteasas:

- 0,5 mM de PMSF.
- 10 µg/ml de aprotinina.
- 10 µg/ml de leupeptina.

### **B) Procedimiento.**

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

1. *Crosslinking* del factor de interés al DNA añadiendo directamente al medio de cultivo formaldehído a una concentración final del 1%. Dejar en agitación a temperatura ambiente durante 12 minutos.
2. Añadir de glicina a una concentración final de 0,125 M para parar la reacción de fijación. Dejar en agitación 5 minutos.
3. Lavar dos veces con PBS frío. A partir de aquí las muestras se han de mantener en hielo.
4. Añadir 2 ml de tampón de lisis (~200  $\mu$ l por cada  $10^6$  células) y rascar con el *Scraper*.
5. Hacer alícuotas de aproximadamente  $10^6$  células (~200  $\mu$ l) y incubar durante diez minutos en hielo.
6. Sonicar ajustando a ciclo 1 y amplitud 80% durante 10 segundos con un número creciente de pulsos. Entre pulso y pulso se dejan las muestras en hielo al menos 1 minuto (en este punto se puede parar el ensayo y congelar las muestras a -80 °C)
7. Romper el crosslinking añadiendo 20  $\mu$ l de NaCl 5M y calentar durante 4-5 horas a 65 °C.
8. Añadir 10  $\mu$ l de EDTA 0,5M, 20  $\mu$ l de Tris-HCl pH 6,5 1M y 2  $\mu$ l de proteinasa K e incubar a 42 °C durante 1 hora.
9. Correr en un gel de agarosa al 2% una muestra (10-20  $\mu$ l) de cada tubo de DNA con distinto número de pulsos de sonicación y visualizarlo por tinción con bromuro de etidio. El número de pulsos óptimos de sonicación es aquella que muestra un *smear* intenso entre 200 y 600 bp.

### 11.2 Preparación de Proteína A/DNA de esperma de salmón sefarosa.

El complejo DNA/proteína/anticuerpo es inmunoprecipitado mediante bolitas de proteína A sefarosa bloqueadas con BSA y DNA de esperma de salmón para evitar interacciones inespecíficas. Estas bolitas bloqueadas se pueden comprar preparadas, pero en esta tesis se bloquearon de modo manual.



## **Materiales y Métodos**

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

- TE (10 mM Tris pH 8; 1mM EDTA pH 8).
- BSA.
- Bolas de proteína A sefarosa.

### **B) Procedimiento.**

1. Calcular el volumen de bolas de proteína A sefarosa que se necesitarán.
2. Lavarlas dos veces con TE.
3. Teniendo en cuenta que el volumen final será el doble que el volumen de las bolitas, añadir DNA de esperma de salmón a una concentración final de 0,2 mg/ml y BSA a una concentración final de 1 mg/ml. Ajustar hasta el volumen final con TE.
4. Agitar e un orbital durante 45 minutos a 4°C.

## **11.3 Ensayo de ChIP.**

Una vez optimizado el protocolo de fragmentación de la cromatina se puede realizar el ensayo de ChIP.

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

- Tampón de dilución (SDS 0,01 SDS; 1,1% Triton X-100; EDTA 1,2 mM; 16,7 mM Tris-HCl pH 8,1; 167 mM NaCl).
- Proteína A/DNA de esperma de salmón sefarosa.
- Anticuerpo.

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

- Tampón de lavado con baja concentración de sales (0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8,1; 159 mM NaCl).
- Tampón de lavado con alta concentración de sales (0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8,1; 500 mM NaCl).
- Tampón de lavado con LiCl (0,25 M Lic.; 1% NP40; 1% deoxycholate; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8,1).
- TE.
- Tampón de elución preparado al instante (1% SDS; 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>).
- NaCl 5M.
- EDTA 0,5 M.
- Tris HCl 1 M, pH 6,5.
- Proteinasa K.
- Fenol:Cloroformo:alcohol isoamilico 25:24:1.
- Etanol absoluto y al 70%.
- Microcentrifuga a temperatura a 4°C.

A los tampones se le añade antes de empezar inhibidores de proteasas:

- 0,5 mM de PMSF.
- 10 µg/ml de aprotinina.
- 10 µg/ml de leupeptina.

### **B) Procedimiento.**

1. Los 6 primeros pasos son idénticos a los seguidos en la puesta a punto de la fragmentación de la cromatina. Las muestras salvo que se indique lo contrario se han de mantener en hielo.
2. Centrifugar las muestras sonicadas a 13000 rpm a 4 °C durante 10 minutos.
3. Descartar el *pellet* y diluir el sobrenadante 10 veces con tampón de dilución. En este punto se debe guardar hasta el proceso de rotura del *crosslink* un 10% del volumen de la muestra que servirá como *input* (material de partida).

## Materiales y Métodos

4. Para reducir uniones inespecíficas prelavar la muestra con 50  $\mu$ l de Proteína A/DNA de esperma de salmón sefarosa en un orbital a 4 °C durante 1 hora.
5. Centrifugar brevemente y recuperar el sobrenadante.
6. Añadir el anticuerpo (la cantidad varía entre anticuerpo) e incubar toda la noche en un orbital a 4 °C.
7. Añadir 30  $\mu$ l de bolitas de proteína A/DNA de esperma de salmón sefarosa e incubar a 4 °C con un orbital para unir a la proteína A el complejo DNA-factor-anticuerpo.
8. Centrifugar brevemente y descartar el sobrenadante.
9. Lavar durante 3-5 minutos rotando con 1 ml de tampón con baja concentración de sales.
10. Lavar durante 3-5 minutos rotando con 1 ml de tampón con alta concentración de sales.
11. Lavar durante 3-5 minutos rotando con 1 ml de tampón con baja concentración de sales.
12. Lavar durante 3-5 minutos rotando con 1 ml de tampón con LiCl.
13. Lavar 2 veces durante 3-5 minutos rotando con 1 ml de TE. En el último lavado se cambia de tubo.
14. Eluir el complejo DNA-factor del anticuerpo añadiendo 0,25 ml de tampón de elución al *pellet* de proteína A sefarosa-anticuerpo-DNA-factor. Mezclar brevemente y rotar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Centrifugar brevemente, recuperar el eluido en otro tubo y repetir el proceso. Combinar las dos eluciones.
15. Romper el *crosslinking* añadiendo 20  $\mu$ l de NaCl 5M y calentar durante 4-5 horas a 65 °C.
16. Añadir 10  $\mu$ l de EDTA 0,5M, 20  $\mu$ l de Tris-HCl pH 6,5 1M y 2  $\mu$ l de proteinasa K e incubar a 42 °C durante 1 hora.
17. Recuperar el DNA por extracción con fenol-cloroformo y precipitar con etanol.
18. Resuspender el *pellet* de DNA en agua.
19. Realizar PCR con *primers* que amplifiquen unos 200-400 bp de la secuencia de interés.

20. Visualizar los productos de PCR en gel de agarosa al 3% y tinción con bromuro de etidio.

Antes de realizar la PCR las condiciones deben haberse puesto a punto. Los *primers* deben amplificar 200-400 bp y situarse a 5' y 3' de la caja de unión del factor de transcripción o coactivador de interés. La ChIP es una técnica de enriquecimiento de cromatina asociada a una proteína determinada, no se produce una completa purificación, por tanto es inevitable cierta contaminación con DNA inespecífico. Por esta razón la PCR debe pararse cuando aún está en fase lineal. Se debe utilizar como control *primers* que amplifiquen zonas irrelevantes donde no se espera la unión del factor. Es conveniente añadir un control en el que no se añade anticuerpo o el anticuerpo es irrelevante para descartar uniones inespecíficas del DNA al anticuerpo o a las bolas de sefarosa. Por otra parte, es aconsejable utilizar un control positivo, si es posible, la primera vez que se inmunoprecipita con un anticuerpo pues anticuerpos que funcionan en otras aplicaciones no siempre funcionan en la ChIP.

Los *primers* utilizados han sido los siguientes:

CI-PGC1-F: 5'-ACGTTAAATACAGCGGTGGATGTTA-3'

CI-PGC1-R: 5'-TAGAGGGCCAGGCCTAGGGTGAAGT-3'

CI-MEF2-F: 5'-GTGCAGTGGCATGATCTCGGCTCA-3'

CI-MEF2-R: 5'-GGCGAGGCGGGTGCATCGGGAGTT-3'

Ciclofilina-F: 5'-CAAATGCTGGACCCAACACAA-3'

Ciclofilina-R: 5'-CCTCCACAATATTCATGCCTTCTT-3'

## 12 Valoración de proteínas.

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

## **13 *Western Blot*.**

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

### **13.1 Electroforesis SDS-PAGE.**

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

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

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

### A) Soluciones y reactivos.

- Tampón de electroforesis 10x (Trizma base 250 mM; Glicina 1,91 M; 1% SDS).
- Tampón de carga Laemmli 3x (LSB x3) (4 ml Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8; 12 ml de glicerol 100%; 4 ml de SDS 30%; 1 mg de azul de bromofenol (BPB); se ajusta a 20 ml con H<sub>2</sub>O).
- Tampón LSB x3 con  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%.
- Gel de separación (Acrilamida 7,5-12%; Bis-N, -metilen-bis-acrilamida al 0,27%; 0,043% APS; TEMED 2,2 mM).
- Gel de empaquetamiento (Acrilamida 3,3%; Bis-N, -metilen-bis-acrilamida al 0,088%; 0,1% APS; 0,1% SDS; TEMED 6,6 mM).
- Fumarasa preteñida (Sigma) al 0,02% en tampón de LSB x1. Se conserva alicuotada a -20 °C.
- Marcadores de peso molecular preteñidos, preparados en tampón LSB x1 (BioRad).

### B) Procedimiento.

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

1. Se añaden entre 15-100  $\mu$ g de proteína en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Se igualan los volúmenes con agua bidestilada y añadimos el tampón de LSB x3 con  $\beta$ -mercaptoetanol de forma que éste quede diluido 3 veces.
3. Hervimos las muestras y la fumarasa preteñida a 95 °C durante 5 minutos. No es necesario hacerlo con los marcadores de pesos moleculares. Se ponen en hielo unos minutos para enfriar la mezcla.
4. Centrifugamos a velocidad máxima durante unos segundos. Las muestras están preparadas por cargar.

## Materiales y Métodos

5. El gel se suele preparar antes que las muestras y generalmente el mismo día en que se utiliza.
6. Cargamos los marcadores de pesos moleculares, las muestras y la fumarasa con una jeringa Hamilton.
7. Colocamos la tapa con los electrodos y llevamos a cabo la electroforesis durante aproximadamente 1 h a 125 V. Detenemos el proceso cuando el frente marcado por el BFB llega hasta el final del gel.
8. Desmontamos el sistema y separamos el gel de los cristales. Procedemos a la transferencia de las proteínas a una membrana de difluoruro de poli-vinilideno (PVDF).

### 13.2 Transferencia de proteínas.

Hemos utilizado el sistema *Mini-Protean TransBlot Cell* de BioRad. Las proteínas se han transferido a una membrana de PVDF (Inmobilon-P, Millipore). Este material hidrofóbico es mucho más resistente que la nitrocelulosa.

#### A) Soluciones y Reactivos.

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

#### B) Procedimiento.

1. Tras la electroforesis se descarta el gel de empaquetamiento (*stacking gel*). El gel de separación se separa y se sumerge en tampón de transferencia.
2. Se corta una membrana de igual medida que el gel, se incuba en metanol durante unos 30-60 segundos, después en agua bidestilada durante 2 minutos hasta que esté

- completamente hidratada, y finalmente se sumerge en tampón de transferencia. Se cortan 2 rectángulos de papel Whatmann 3MM ligeramente más grandes que el gel.
3. Se prepara un recipiente con tampón de transferencia y se utiliza para montar el sándwich de transferencia. Éste estará compuesto por: una esponja rectangular (suministrada con el sistema), uno de los rectángulos de papel Whatmann, el gel marcado para poder reconocer su orientación, la membrana marcada del mismo modo, el otro papel Whatmann y una segunda esponja. Se procura que no queden burbujas entre el gel y la membrana, que podrían afectar a la transferencia. Cerramos este casete procurando no mover el sándwich.
  4. Colocamos el casete en la cubeta de transferencia asegurándonos que la orientación sea la correcta: las proteínas migran del gel hacia la membrana al desplazarse hacia el polo positivo. Introducimos un bloque de hielo (soporte suministrado con el sistema) que evitará un excesivo calentamiento del sistema durante la transferencia. Llenamos la cubeta con tampón de transferencia y aplicamos una corriente constante de 250 mA durante 1 hora. Mantenemos el tampón de transferencia en agitación con una varilla magnética.
  5. Desmontamos el sistema evitando que la membrana se seque. Las bandas correspondientes al marcador y la fumarasa preteñidos nos dan idea de la eficiencia de la transferencia.
  6. Colocamos la membrana en un recipiente con solución de bloqueo (apartado siguiente).

### 13.3 Ensayo de inmunodetección.

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

El bloqueo de la membrana, que se consigue incubándola con una solución rica en proteínas, previene la unión inespecífica del anticuerpo. El segundo paso permite la detección de la proteína de interés por parte del anticuerpo. El complejo proteína-



## **Materiales y Métodos**

anticuerpo es reconocido por un anticuerpo secundario que permite su detección por ECL y una amplificación de la señal.

### **A) Soluciones y Reactivos.**

- Solución de bloqueo: leche desnatada al 5% en PBS.
- Solución de anticuerpo primario: preparados en solución de bloqueo diluida en PBS (1% leche).
- TBS x1 (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM. Se ajusta el pH a 7,5).
- Solución de anticuerpo primario. Los utilizados en esta tesis han sido los siguientes:  
. Anticuerpo policlonal anti-Mfn2 producido en conejo en nuestro laboratorio. Anticuerpo monoclonal anti-Porina (Cat. 529536. Calbiochem, La Jolla, CA). Anticuerpo monoclonal producido en ratón.
- Tampón de lavado: Tween-20 al 0,2% en PBS x1.
- Anticuerpos secundarios: Comerciales, producidos en oveja y acoplados a la HRP. Dirigidos contra IgG de conejo o ratón.
- Reactivo ECL (Amersham, cat. RPN 2209). Se prepara mezclando 5 ml del reactivo 1 con 5 ml del reactivo 2. Se puede conservar preparada durante 24 horas. Es recomendable preparar este reactivo inmediatamente antes de ser utilizado.

### **B) Procedimiento.**

1. Incubamos la membrana con solución de bloqueo durante 1 hora a 37 °C en un baño con agitación.
2. Sellamos la membrana dentro de una bolsa de plástico y añadimos 5 ml de solución de anticuerpo primario. Lo incubamos en agitación orbital a 4 °C durante 16-18 horas o 1 h a 37 °C.
3. Recuperamos la solución de anticuerpo y la conservamos. Lavamos la membrana con 100-150 ml de tampón de lavado durante 10 minutos a 37 °C y con agitación.
4. Repetimos el paso anterior dos veces más.

5. Incubamos en 5-10 ml de la solución de anticuerpo secundario adecuada (dependiendo de la especie en que se ha producido el anticuerpo primario) y lo mantenemos a temperatura ambiente y agitación orbital durante al menos 1 hora.
6. Descartamos la solución de anticuerpo. Lavamos la membrana 3 veces con tampón de lavado a 37 °C y agitación durante 10 minutos cada vez.
7. Incubamos la membrana durante 1 minuto con el reactivo de ECL. La ponemos en una bolsa de plástico para evitar que se seque y exponemos en una película fotográfica con la membrana a temperatura ambiente.
8. La membrana se puede reutilizar incubándola con otro anticuerpo (a partir del paso 2) siempre y cuando la señal de la proteína que se quiere detectar no se confunda con la de la proteína previamente detectada. En nuestro caso, en vez de hacer una segunda incubación posterior, cortamos la membrana en dos trozos e incubamos cada parte con el anticuerpo correspondiente. Este corte debe hacerse utilizando los marcadores de pesos moleculares como referencia para saber aproximadamente la altura a la que se encuentran las proteínas que queremos detectar.

## **14 Northern blot.**

Esta técnica permite la detección de la presencia, niveles y tamaño de transcritos específicos de mRNA de una preparación de RNA total. La manipulación de las muestras debe ser cuidadosa para prevenir contaminaciones por RNAsas procedentes del medio ambiente o de las manos del manipulador. En este sentido es imprescindible el uso de guantes y de soluciones libres de RNAsas. Todas las soluciones deben ser preparadas con agua tratada con DEPC, se deben utilizar reactivos de uso específico libres de RNAsas y material de vidrio sometido a esterilización a 200°C durante por lo menos 4 horas. El material de plástico estéril debe ser reservado por este uso exclusivo. El pH de las soluciones tiene que ser medido con tiras de pH tomando muestras de la solución y añadiéndolas sobre la tira.

## **Materiales y Métodos**

El protocolo de *Northern Blot* consiste en los pasos siguientes: preparación de las muestras, síntesis de la sonda marcada, preparación y carga del gel, transferencia a una membrana, hibridación con la sonda y detección.

### **14.1 Obtención de RNA total.**

Para la obtención de las muestras de RNA se han utilizado el *kit* de GibcoBRL Trizol<sup>®</sup>, basado en el método de Chomczynski y Sacchi. El reactivo mantiene la integridad del RNA mientras se lisan las células. La adición de cloroformo, seguido de centrifugación, separa la solución en una fase orgánica y otra acuosa. El RNA se encuentra exclusivamente en la fase acuosa. El RNA es precipitado de la fase acuosa con alcohol isopropílico.

### **14.2 Preparación del gel.**

Los geles de RNA se preparan en condiciones desnaturalizantes (en presencia de formamida). Las condiciones desnaturalizantes aseguran una migración electroforética del RNA proporcional a su medida. Se añade bromuro de etidio a la muestra para poder visualizarla.

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

- Tampón de electroforesis 10x (MOPS 400 mM pH 7; Acetato sódico 100 mM; EDTA 10 mM).
- Tampón de carga 2x (Ambion, cat.8546G).
- Gel de agarosa/formaldehído (1% agarosa; 0,66M Formaldehído. Se disuelve en tampón de electroforesis).
- Bromuro de etidio 400 µg/ml.

#### **B) Procedimiento.**

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

1. Añadimos en un tubo de microcentrífuga la cantidad de RNA que se quiere analizar (18  $\mu\text{g}$ ).
2. Lo resuspendemos en tampón de carga de RNA 2x y 1  $\mu\text{l}$  de la solución de bromuro de etidio.
3. Desnaturalizamos las muestras a 65°C durante 5-10 minutos. Las dejamos en hielo hasta el momento de cargarlas en el gel.
4. Preparamos el gel de agarosa/formaldehido (una concentración del 1% de agarosa permite una buena resolución de los pesos moleculares del rango 0,4-6 kb) en tampón de electroforesis 1x diluido en H<sub>2</sub>O-DEPC: fundimos la agarosa en un microondas y posteriormente añadimos el formaldehido al gel en una campana extractora, mezclamos y añadimos la mezcla a la cubeta preparada con un peine para formar los pozos. Lo dejamos polimerizar.
5. Extraemos el peine, situamos el gel en el sistema de electroforesis y añadimos tampón de electroforesis hasta que quede cubierto.
6. Cargamos las muestras incluyendo un carril con marcadores de peso molecular (0,5  $\mu\text{g}$  de RNA *ladder*, GIBCO-BRL). Corremos el gel a 40 V durante 4-5 horas.

### 14.3 Transferencia.

- Membrana de nylon (Hybond-N y Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham).
- Papel Whatmann.
- Papel de filtro.
- SSC 20x (citrato sódico 0,3 M pH 7, NaCl 3 M y H<sub>2</sub>O DEPC).
- UV Stratalinker<sup>®</sup> 1800 (Stratagene).

### Procedimiento.

1. Corremos el gel de RNA en condiciones desnaturalizantes.
2. Tras la electroforesis, comprobamos en un transiluminador la migración y estado de las muestras. Hacemos una foto.

## Materiales y Métodos

3. Colocamos un cristal de 15x20 cm en una cubeta con 500 ml de tampón 10xSSC de forma que se mantenga sostenido por las esquinas de la cubeta. Colocamos sobre el cristal un fragmento de papel Whatmann de la misma anchura que el gel pero más largo de forma que sus extremos queden sumergidos en el tampón de transferencia inferior. Haciendo rodar una varilla de vidrio eliminamos las burbujas de aire atrapadas entre el papel y el cristal.
4. Cortamos los pozos del gel y lo colocamos sobre el papel Whatmann de forma que la cara superior del gel quede en contacto con el papel (la base de los pozos queda hacia arriba). Humedecemos el gel en tampón de transferencia. Rodeamos el gel con Parafilm para asegurar que el tampón sólo pasará a la membrana a través del gel.
5. Colocamos un fragmento de membrana Hybond-N<sup>+</sup> de la misma medida del gel encima de éste procurando que no queden burbujas de aire entre ellos. Extraemos las burbujas que queden atrapadas rodando con una varilla de vidrio. Conviene marcar la membrana para poder reconocer fácilmente su orientación y el orden de las muestras.
6. Ponemos un papel Whatmann de las mismas dimensiones sobre la membrana. Eliminamos las burbujas que puedan quedar y colocamos dos hojas más de papel Whatmann.
7. Apilamos (hasta unos 10 cm de altura) papel de filtro seco de las mismas dimensiones que la membrana encima del papel Whatmann. Colocamos en la parte superior un cristal plano y encima un peso de unos 500 g.
8. Transferimos durante 16-24 horas.
9. Desmontamos el sistema, lavamos la membrana en ddH<sub>2</sub>O para eliminar los restos de agarosa y de sales de la membrana.
10. Fijamos el RNA a la membrana por irradiación con U.V.
11. Hacemos una foto de la membrana para tener constancia de la eficiencia de la transferencia..
12. Guardamos la membrana a 4°C dentro de una bolsa sellada hasta que se proceda a la hibridación.

#### 14.4 Síntesis de la sonda marcada.

Las sondas utilizadas se obtuvieron por marcaje de fragmentos de cDNA recuperados por digestión con enzimas de restricción y purificación de la banda de interés (apartados 3.3 y 3.5). El marcaje se llevó a cabo por cebado aleatorio (*random priming*).

El método de cebado aleatorio consiste en la elongación de hexanucleótidos aleatorios por el fragmento Klenow de la DNA-polimerasa de *E. coli*. Se incluye en la reacción un nucleótido radiactivo ( $\alpha^{32}$ -P-dCTP). El DNA molde es el fragmento de cDNA del gen de interés. La mezcla de hexanucleótidos contiene todas las combinaciones posibles de las cuatro bases tomadas de seis en seis. Hemos utilizado el kit *rediprime 2* (Amersham Pharmacia, cat.# RPN 1633) siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema es muy sencillo pues en el *kit* se hallan todos los reactivos liofilizados en un tubo excepto el DNA y el nucleótido radiactivo. El nucleótido radiactivo proviene de la casa comercial Amersham. La sonda marcada se separa de los nucleótidos no incorporados mediante columnas de cromatografía de exclusión molecular (MicroSpin G-25 Columns).

#### 14.5 Hibridación y lavados.

Determinamos la temperatura de hibridación y de lavado según la temperatura de fusión (de desnaturalización) del complejo DNA:RNA. Hemos llevado a cabo tanto la hibridación como los lavados en condiciones astringentes. Por lo general hemos prehibridado e hibridado a 65°C.

La prehibridación que bloquea la membrana para impedir la unión inespecífica del sonda y la hibridación de la sondase ha realizado con la solución de hibridación comercial *Rapid Hyb Buffer*, de Amersham Pharmacia (cat.# RPN1635). La ventaja de esta solución comercial es que la prehibridación e hibridación se realiza con el mismo tampón y en tiempos muy inferiores a los utilizados con tampones caseros.

## **Materiales y Métodos**

### **A) Materiales y reactivos.**

- Tubo de hibridación.
- Incubador de hibridación.
- Tampón SSC/ 0,1% SDS.

### **B) Procedimiento.**

1. Introducimos la membrana en un tubo de hibridación. Añadimos la solución de prehibridación. Incubamos a 65°C con agitación durante 45 minutos. El kit permite la prehibridación durante 15 minutos.
2. Decantamos la solución de prehibridación y añadimos la solución de hibridación. Incubamos a 65°C y con agitación durante dos horas.
3. Decantamos la solución de hibridación y transferimos la membrana a un contenedor con SSC 2x. Lavamos brevemente a temperatura ambiente.
4. Posteriormente se realiza una serie de lavados con SSC 1x/SDS 0,1% →SSC 0,5x/SDS 0,1%→SSC 0,1x/SDS 0,1%. Durante tiempos de aproximadamente 10 minutos cada lavado y temperaturas variables, normalmente los dos primeros a temperatura ambiente y los dos últimos a 65 °C, pero las condiciones de lavado se pueden variar dependiendo de la intensidad de la radiactividad que se monitoriza con un contador Geiger y/o que ésta no se halle distribuida homogéneamente en toda la membrana, lo que indicaría uniones inespecíficas.
5. Cuando la radiación monitorizada con un contador geiger se halla localizada donde se espera que halla migrado nuestro mRNA y con la intensidad adecuada (no menos de 1000 cpm) cubrimos la membrana con papel de plástico y la exponemos a una película fotográfica.

## 15 Medida de cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ).

Para realizar este tipo de medidas se utilizan sondas fluorescentes sensibles al  $\Delta\Psi$  mitocondrial o *mitochondrial dyes*. Existen una gran variedad de este tipo de sondas que emiten fluorescencia a longitudes de onda diferentes. Estos reactivos, son moléculas catiónicas y lipofílicas, su unión a las membranas fosfolipídicas depende de la carga en la superficie y del potencial de membrana. A las mitocondrias, se acumulan en la matriz mitocondrial debido a su carga negativa y gracias a la solubilidad que presentan tanto en la membrana mitocondrial interna como en la matriz. La intensidad de fluorescencia de las sondas será proporcional al  $\Delta\Psi$  mitocondrial.

### 15.1 Medida del $\Delta\Psi$ mediante la sonda DiIC<sub>1</sub>(5).

Se utilizó la sonda DiIC<sub>1</sub>(5) (Indocarbocianina de cadena alquil corta), ya que presentaba una longitud de onda ( $\lambda$ ) de emisión diferente a la de la proteína GFP. La  $\lambda$  de emisión del DiIC<sub>1</sub>(5) es 675 nm y la de la proteína GFP es 525 nm.

#### A) Soluciones y reactivos.

- DiIC<sub>1</sub> (5) (Molecular Probes, H-14700) disuelta en DMSO, se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  y protegida de la luz, a una concentración stock de 100 mM
- CCCP ( Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone; N° catálogo: 21855, Sigma-Aldrich)
- PBS
- Material estándar de cultivos
- Medio DMEM incompleto.



### B) Procedimiento.

1. Se parte de células creciendo en placas de 6 pozos (en este trabajo se utilizó células 10T1/2 y células 10T1/2 transfectadas establemente con un cDNA antisentido de Mfn2). Se tripsinizan las células y se resuspenden en 2 ml de medio incompleto y se depositan en tubos de 15 ml. Se añade la sonda al tubo de modo que quede en una concentración final de 250 ng/ml y se deja incubar a 37 °C en agitación y protegidas de la luz.
2. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugan las células, y el precipitado se lava con PBS. Se realiza un segundo lavado, para eliminar el exceso de sonda no unida o unida inespecíficamente.
3. Después del último lavado, se resuspenden las células en 0,5-1 ml de PBS y se analiza la fluorescencia del DiIC<sub>1</sub>(5) en el citómetro de flujo.
4. Para validar que la sonda utilizada es sensible a cambios específicos de  $\Delta\Psi$  mitocondrial, cada medida de fluorescencia obtenida, se vuelve a realizar añadiendo a la muestra el desacoplador CCCP (agente que disipa el  $\Delta\Psi$ ).

### 15.2 Validación de la sonda dependiente de $\Delta\Psi$ . Elección de la concentración de CCCP.

Para cada sonda utilizada en la medida de  $\Delta\Psi$  y para cada línea celular es necesario determinar previamente las concentraciones de CCCP en las que el  $\Delta\Psi$  se disipa completamente respecto a una situación control.

En este trabajo, para la elección de la [CCCP] se probaron el siguiente rango de concentraciones: 0, 5, 10, 25, 50 i 100  $\mu\text{M}$  y después de 5 minutos de reacción se analizó la fluorescencia del DiIC<sub>1</sub> (5). Se obtuvieron valores mínimos de fluorescencia entre las concentraciones 25 y 50  $\mu\text{M}$ . Entre 50 y 100  $\mu\text{M}$  la fluorescencia no variaba. Por lo que se utilizó la concentración de sonda a 50  $\mu\text{M}$  para desacoplar el  $\Delta\Psi$ . Se analizó también el efecto del DMSO (reactivo en el que se disuelve la sonda).

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

### Reference List

Bach,D., Pich,S., Soriano,F.X., Vega,N., Baumgartner,B., Oriola,J., Daugaard,J.R., Lloberas,J., Camps,M., Zierath,J.R., Rabasa-Lhoret,R., Wallberg-Henriksson,H., Laville,M., Palacin,M., Vidal,H., Rivera,F., Brand,M., and 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.

Bhavsar,P.K., Dellow,K.A., Yacoub,M.H., Brand,N.J., and Barton,P.J. (2000). Identification of cis-acting DNA elements required for expression of the human cardiac troponin I gene promoter. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32, 95-108.

Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.

Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.

Nadal-Ginard,B. (1978). Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell* 15, 855-864.

## Regulación transcripcional del gen de Mitofusina 2 en músculo esquelético

El gen humano que codifica para Mitofusina 2 (*Mfn2*) fue identificado por el Dr. Bach en nuestro grupo de investigación en estudios de hibridación substractiva encaminados a la identificación genes diferencialmente expresados en músculo esquelético en condiciones de resistencia a la insulina (Bach et al., 2003). *Mfn2* es una proteína de fusión mitocondrial (Bach et al., 2003; Rojo et al., 2002; Santel y Fuller, 2001).

Durante la tesis doctoral del Dr. Bach se propuso que *Mfn2* podría jugar un papel relevante en la biología mitocondrial así como en la fisiopatología de la obesidad y/o la diabetes basándose en las siguientes evidencias experimentales:

- a) *Mfn2* es una proteína mitocondrial.
- b) La expresión génica de *Mfn2* se reprime en músculo esquelético de sujetos obesos y de pacientes diabéticos de tipo 2.
- c) La represión de *Mfn2* reduce el consumo de oxígeno, el potencial de membrana mitocondrial y la oxidación de glucosa en células en cultivo.

Sobre la base de estas observaciones y dado que *Mfn2* presenta desregulación en situaciones fisiopatológicas como la obesidad o la diabetes, el objetivo general de esta tesis doctoral ha sido estudiar la regulación transcripcional de *Mfn2*. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la región promotora del gen de la *Mfn2*.
- Estudiar los cambios en la expresión de *Mfn2* en músculo esquelético condiciones de de mayor consumo energético y el análisis del mecanismo molecular por el que se producen.
- Estudio de la expresión de *Mfn2* en fibras musculares glucolíticas y oxidativas y análisis de los posibles factores de transcripción implicados.

## 1. CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DE *Mfn2*.

### El promotor proximal del gen de *Mfn2* humano se halla en una isla CpG.

El gen humano de *Mfn2* se halla en el cromosoma 1, más concretamente en el locus 1p36.22. Inicialmente se describió un único origen de transcripción. En la figura 3 se muestra la secuencia del promotor proximal de *Mfn2*, el primer exón (sombreado) y parte del primer intrón. En las proximidades del origen de transcripción descrito, destaca una gran proporción de G y C que se extiende a lo largo de la mayor parte de la secuencia mostrada y la carencia de una caja TATA. En el genoma de muchos vertebrados los dinucleótidos CpG se hallan pobremente representados debido a que forman un substrato para la DNA metiltransferasa. La metilación de la citosina formando 5-metilcitosina puede deaminarse formándose timina que no se repara por las enzimas reparadoras del DNA (Bird, 2002). Sin embargo, existen regiones en el genoma de 0,5-2 kb que tienen una proporción relativamente alta de dinucleótidos CpG denominadas islas CpG. En 1987 Gardiner-Garden y Frommer definieron una isla CpG (Gardiner-Garden y Frommer, 1987) como una secuencia de al menos 200 bp con un contenido alto de C+G (mayor del 50%) y la relación de CpG observados/ CpG esperados mayor o igual a 0,6. Se ha estimado que en mamíferos las islas CpG se hallan asociadas con aproximadamente la mitad de los promotores de genes codificantes de proteínas (Smale y Kadonaga, 2003). Dado el alto contenido de C+G en el promotor humano de *Mfn2* quisimos saber si en efecto se hallaba en una isla CpG. Para ello, se utilizó el programa EMBOSS del EMBL-EBI que determina posibles islas CpG.

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos al introducir en el programa la secuencia del gen de *Mfn2* humano con las bases comprendidas entre -600 y +600 respecto

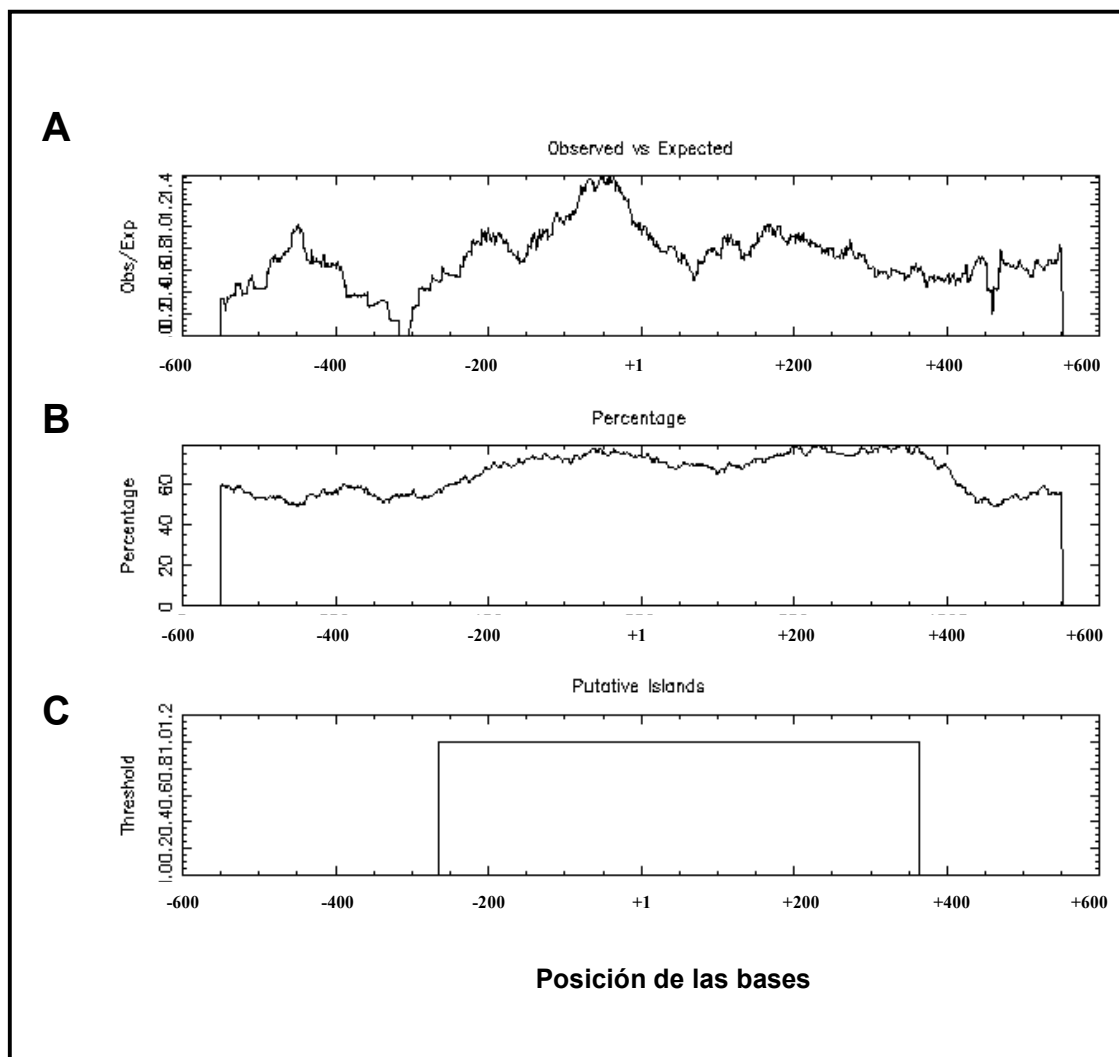
## Resultados

al origen de transcripción descrito en aquel momento. En la figura 4 A, que muestra la relación de CpG observados/ CpG esperados, se pueden observar dos regiones cuya relación supere el valor de 0,6, entre -500 y -400, pero que no cumple los criterios para ser

<b>-360</b>	cttcaccctaggcctggccctctagagaacactcctctaagattacagaatgcaaactctg
<b>-300</b>	gattccagagctggcagaggccccagggtcaggctctaggacaaccggcgaaaaagcggg
<b>-240</b>	aacctctactccacgcccttggtttttcgcccccttgacagcttgaggctccgccccgctt
<b>-180</b>	tgccccgccccccagctccggccgacgcccaccggaactacagccccatgatgcagtg
<b>-120</b>	ggagtcgagcctctgcgtcgtccgcttgggacgcgcggcgaggagtggcgcgcggag
<b>-60</b>	gagtggcgcgctgagacgcccgtcgaagcgcgagtcgcggggcagcagaggcgtaagga
<b>+1</b>	gtaggcggggcgagccggctgggctcagggctcaccagctcaccgggtcgaggggcaat
<b>+61</b>	ctgaggcgactggtgacgcgcttatccacttcctcctcccgcctccccctgggggtggcg
<b>+121</b>	ctcgctggtgacgtagtgagtgatggccgcccggaggccgggaaggtgaaggtgagag
<b>+181</b>	ggcgagcaagccgggtggcggggactggccccggccccggccggcgagtcctgagcagct
<b>+241</b>	cggcgtgggcccagcgggattctggggccacgggggtctgggatgcagtcaagcggggctc
<b>+301</b>	ccactctccggcctcgccgcccggccctccccggccctgagaggagggggcgggccacgg
<b>+361</b>	gacctgggactggtcgggtgggggtcccctgtagcttctcatcgccccgcctttccacc

**Figura 3. Secuencia del promotor proximal de Mfn2.** Secuencia del gen humano de *Mfn2* entre las bases -360/+418. La posición +1 corresponde al inicio de transcripción depositado en las bases de datos del EST del NCBI, número de acceso D86987. El sombreado gris indica el primer exón.

isla CpG al ser de un tamaño inferior a 200 bp y no tener una proporción de C+G superior al 50% a lo largo de toda la secuencia. La otra región se expande entre aproximadamente -260 y +360, en ella la relación CpG observados/CpG esperados es superior a 0,6, con valores de aproximadamente 1,2 entre -200 y el inicio de transcripción. A lo largo de estos aproximadamente 620 bp, la proporción de C+G es superior al 60%, cumpliéndose los tres criterios que determinan una isla CpG.



**Figura 4. El promotor proximal del gen de *Mfn2* humano se halla en una isla CpG.** Se utilizó el programa EMBOSS del EMBL-EBI para determinar las posibles islas CpG en la secuencia -600/+600 del DNA humano de *Mfn2*. Gráficamente se representa las CG observadas/CG esperadas (panel A), la proporción de C+G (panel B) y la extensión de la isla CpG (panel C).

**En músculo esquelético humano el gen de *Mfn2* posee varios orígenes de transcripción.**

Una de las características de promotores con islas CpG es que poseen diversos orígenes de transcripción. Los datos iniciales y las secuencias depositadas en las bases de datos indicaban que *Mfn2* sólo tenía un origen de transcripción. Para comprobar esto, se procedió

## Resultados

a determinar el origen de transcripción de *Mfn2* en músculo esquelético humano a partir del kit de Ambion *FirstChoice™ RACE-Ready cDNA*. El cDNA suministrado en el kit proviene de mRNA al que se le ha añadido un adaptador a la *caperuza* de 7-metilguanosa propia del mRNA procesado. Con unos *primers* específicos del adaptador y otros que anillan con el exón 2 de *Mfn2* se realizó una *nested* PCR. El producto de la PCR se corrió en gel de agarosa al 2% y por tinción con bromuro de etidio se visualizaron varias bandas (Fig. 5 A). El producto de PCR se clonó en el plásmido pGEMT-easy y se secuenció. De las secuencias obtenidas se encontraron dos poblaciones mayoritarias, una cuyo origen de transcripción se extendía entre -7 y -4 (inicio 2; 8 clones), siendo +1 el inicio de transcripción depositado en las bases de datos y al que nos referiremos en lo sucesivo, y la otra con el inicio a +58 (inicio 5; 8 clones). Además se observaron inicios de transcripción a -47 (inicio 1; 2 clones), +37 (inicio 3; 1 clon), +52 (inicio 4; 2 clones) y +124 (inicio 6; 1 clon). De las secuencias obtenidas se tiene la seguridad de que provienen de un mRNA procesado, pues el adaptador se une sólo aquellos mRNAs con *caperuza* y se descarta de esta forma la posibilidad que los resultados obtenidos provengan de mRNAs parcialmente degradados.

A pesar de la abundancia de promotores en islas CpG, los elementos responsables de su función basal no están bien definidos. Generalmente estos promotores no poseen caja TATA, elementos DPE o Inr, pero no es extraño que su transcripción se inicie en regiones con una homología débil al Inr consenso aunque lo pueden hacer en secuencias no relacionadas (Smale y Kadonaga, 2003). El análisis detallado de la secuencia del promotor basal (Fig. 5 B) mostró que sólo los orígenes 1 y 5 tenían una secuencia con relativa homología con el elemento Inr y el origen 1 poseía a 28 bp en dirección 3' del origen de transcripción una secuencia con cierta homología con el elemento DPE que potencia el efecto del elemento Inr (Butler y Kadonaga, 2002; Smale y Kadonaga, 2003). En cuanto al inicio 2 que mediante RACE se demostró ser, junto al inicio 5, el más representado, no había elemento Inr, pero entre -60 y -200 existen múltiples cajas de unión a Sp1 (ver más adelante). Una de las características de las islas CpG es la presencia de múltiples cajas de unión del factor de transcripción Sp1. Normalmente la transcripción se inicia entre 40 y 80 bp a 3' de las cajas de unión a Sp1 el cual se supone dirige la maquinaria basal de transcripción (Smale, 1997b; Smale y Kadonaga, 2003).





## Resultados

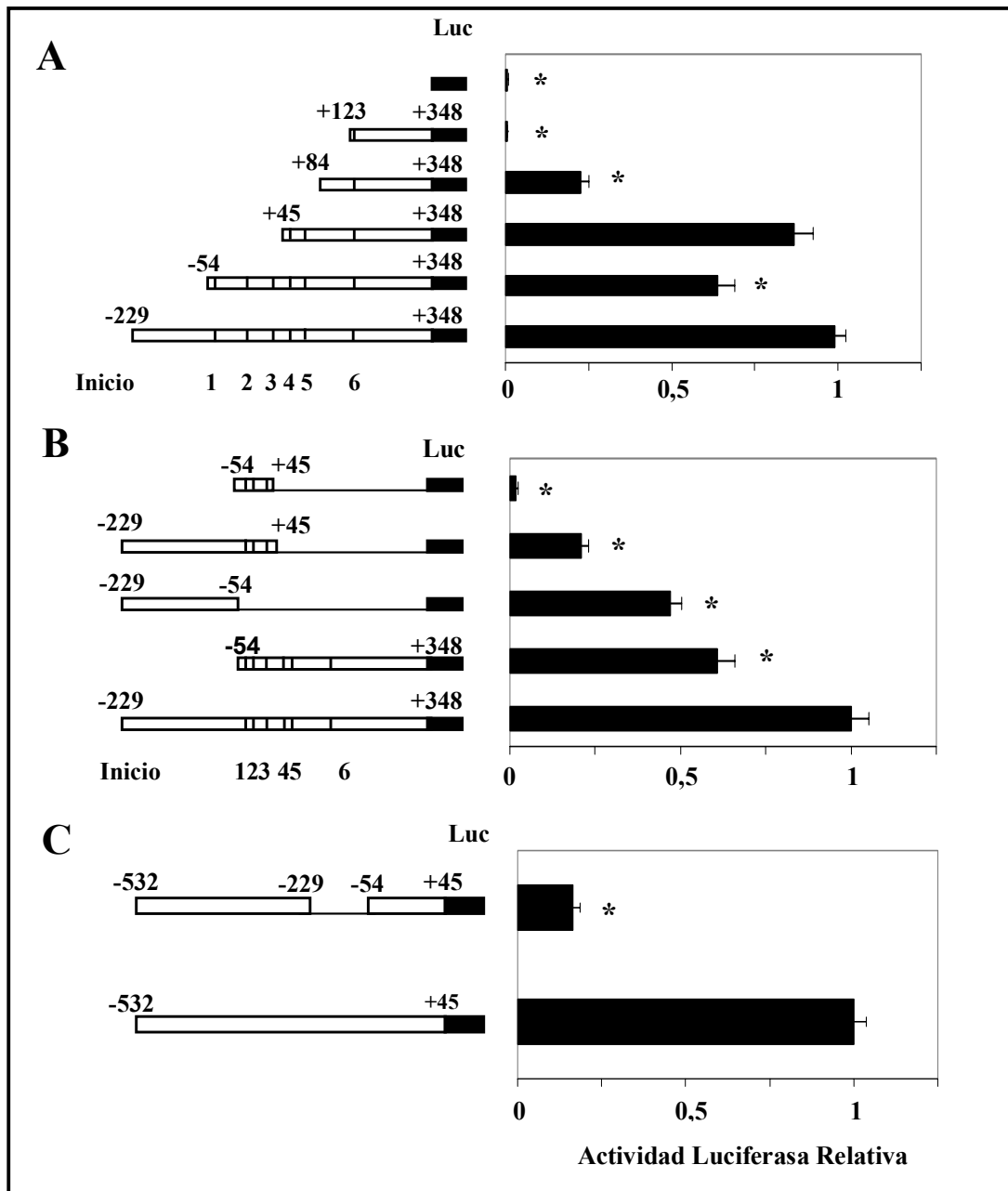
### Caracterización preliminar de la función del promotor basal de *Mfn2*.

Para determinar la actividad transcripcional del promotor basal de *Mfn2* se clonó la región del gen humano de *Mfn2* entre -229 y +348 en el plásmido reportero pGL3 (-229/+348-Luc). A partir de esta construcción se realizaron diversas deleciones como se representan en la figura 6. Las diversas construcciones se transfectaron junto con un vector de expresión de la renilla (pRL) en la línea de fibroblasto murino 10T1/2 y se determinó la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Para corregir las eficiencias de transfección, los valores de actividad luciferasa de cada muestra se normalizaron con los correspondientes valores de renilla. En la figura 6 A se aprecia que la construcción -229/+348-Luc muestra una potente actividad transcripcional (143 veces) cuando se compara con el pGL3-basal, es decir, el plásmido con el gen reportero de la luciferasa pero sin que éste sea dirigido por un promotor. La eliminación de la secuencia -229/+45 y por tanto de los inicios 1, 2 y 3 no produjo cambios significativos en la actividad transcripcional. La actividad transcripcional de la construcción +84/+348-Luc que sólo conserva el inicio de transcripción 6 fue un 75% menor que la de la construcción -229/+348-Luc. La eliminación del fragmento -229/+123 produjo una pérdida total de la actividad transcripcional a pesar de mantener el inicio 6, lo que demuestra la necesidad de secuencias a 5' del inicio de transcripción para permitir la unión al DNA de la maquinaria basal de transcripción y sugiere que a 3' de +124 no existen otros inicios de transcripción en el primer exón.

La eliminación de la región -229/-54 produjo una disminución de un 30% de la actividad transcripcional respecto a -229/+348-Luc, pero cuando el fragmento eliminado fue -229/+45 no se modificó la actividad transcripcional. Para estudiar con más detalle la región -229/+45 se utilizaron otras construcciones representadas en la figura 6 B. La región -229/-54 que no posee inicio de transcripción es capaz de dirigir la transcripción de la luciferasa más fuertemente que la región -229/+45 donde se hallan los inicios 1, 2 y 3 lo que sugiere que en -54/+45 se pueden unir complejos represores. La construcción -54/+45-Luc apenas mostraba el doble de actividad transcripcional que el pGL3-basal.

Una nueva evidencia de la importancia de la región -229/-54 en la funcionalidad del promotor basal de *Mfn2* se obtuvo al eliminar la secuencia -229/-54 de la construcción

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético



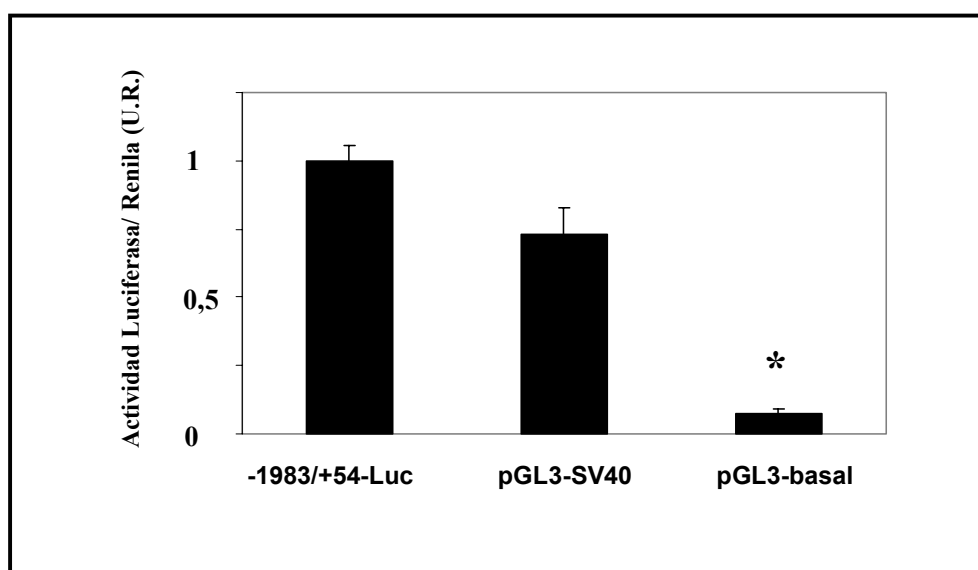
**Figura 6. Actividad transcripcional del promotor basal de *Mfn2*.** Células 10T1/2 fueron cotransfectadas con el plásmido pRL y (panel A) diversas deleciones a 5' del promotor basal dirigiendo al gen de la luciferasa. La actividad transcripcional corresponde al valor de la actividad luciferasa normalizado por la actividad de la renila. (panel B) Deleciones a 5' y 3' que indican un papel importante de la secuencia -229/-54. La barras verticales negras representan los distintos orígenes de transcripción. (panel C) La construcción sin la región -229/-54 muestra un drástico descenso en la actividad promotora. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* indica una diferencia estadísticamente significativa respecto a la construcción mayor,  $p < 0.05$ .

## Resultados

-532/+45-Luc (Fig. 6 C). La actividad transcripcional de -532/+45-Luc delecionado fue un 20% de la construcción -532/+45-Luc indicando la relevancia de la región -229/-54 en el mantenimiento de la transcripción basal de *Mfn2*.

### La región -1983/+45 tiene una actividad promotora fuerte.

Con el objetivo de estudiar el efecto de diversos factores de transcripción en la expresión de *Mfn2* se clonó la región -1983/+45 del gen humano de *Mfn2* en el plásmido reportero pGL3-basal. Su actividad promotora se comparó en células 10T1/2 con el plásmido pGL3-SV40 en el cual el gen de la luciferasa se halla dirigido por el promotor fuerte SV40. La actividad transcripcional de -1983/+45-pGL3 fue sensiblemente superior a la de pGL3-SV40 (Fig. 7).



**Figura 7. La región -1983/+45 tiene una actividad promotora fuerte.** Células 10T1/2 fueron cotransfectadas con el plásmido pRL y el plásmido reportero pGL3 con el gen de la luciferasa dirigido por la región del gen humano de *Mfn2* -1982/+45 (-1982/+45-Luc), el promotor vírico SV40 (pGL3-SV40) o vacío (pGL3-basal). La actividad transcripcional corresponde al valor de la actividad luciferasa normalizado por la actividad de la renilla. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* indica una diferencia estadísticamente significativa respecto a -1982/+45-Luc,  $p < 0,05$ .

### **Sp1 activa al promotor de *Mfn2* y Sp3 lo reprime.**

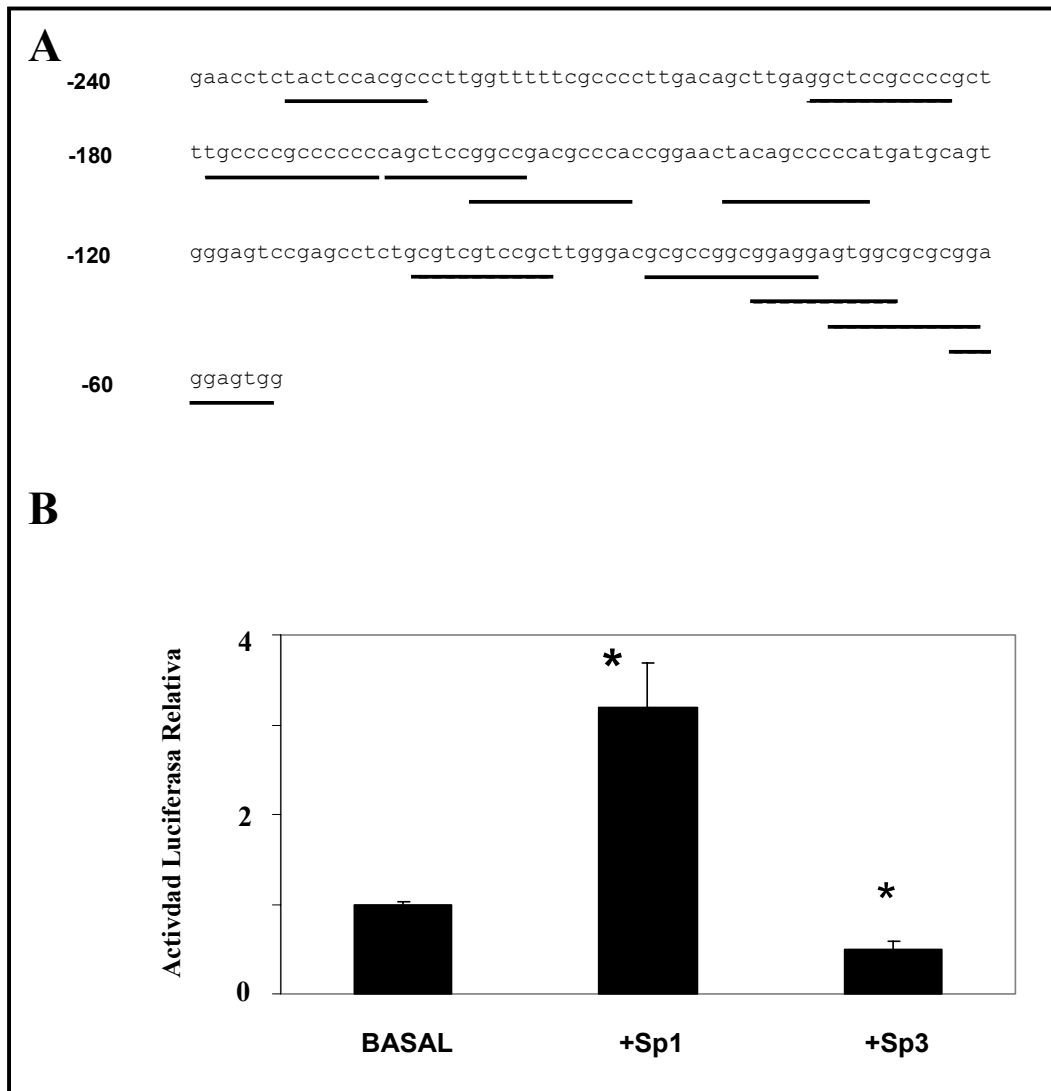
Como se ha visto en la figura 4, la región -229/-54 es de gran importancia en el mantenimiento de la actividad promotora basal de *Mfn2*. En ésta región al igual que en otras regiones del promotor proximal de *Mfn2* se hallan varios posibles cajas de unión a Sp1 (Fig. 8 A) como es común en promotores con islas CpG. Se sugiere que Sp1 puede dirigir, en este tipo de promotores, a la maquinaria basal de transcripción (Smale, 1997a; Smale y Kadonaga, 2003). Para determinar si factores de transcripción Sp1 y Sp3 modulan la expresión de *Mfn2* se cotransfectó en células 10T1/2 el plásmido -1984/+45-Luc junto con vectores de expresión de Sp1 y Sp3 o un vector irrelevante. La actividad luciferasa de las células que sobreexpresaban Sp1 fue más de tres veces superior a la de las células control, mientras que en las células que sobreexpresaban Sp3 se observó una severa reducción en la actividad luciferasa (Fig. 8 B). Esto indica que los miembros de la familia Sp son capaces de regular la transcripción de *Mfn2*. En el promotor de *Mfn2* Sp1 tiene un papel activador de la transcripción y Sp3 es un represor como ya se ha descrito en otros genes (Hagen et al., 1994; Majello et al., 1994; Suske, 1999).

### **Análisis de deleciones del promotor de *Mfn2*.**

Con el objetivo de determinar regiones del promotor de *Mfn2* importantes para su regulación transcripcional se generaron cinco deleciones a 5' de la construcción -1982/+45-Luc. Las líneas 10T1/2 (Fig. 9 A), L6E9 (Fig. 9 B) y HeLa (Fig. 9 C) fueron transfectadas transitoriamente con las deleciones del promotor de *Mfn2* y a las 40 horas se midió la actividad luciferasa. Los resultados obtenidos variaron dependiendo del tipo celular (Fig. 9). Así, la deleción del fragmento -1980/-1330 no modificó la actividad promotora en células 10T1/2 o L6E9, pero en HeLa se observó una disminución de la actividad promotora. Del mismo modo, es destacable que la pérdida de la región -682/-532 provoca un fuerte aumento en la actividad promotora en células 10T1/2 que no se observa

## Resultados

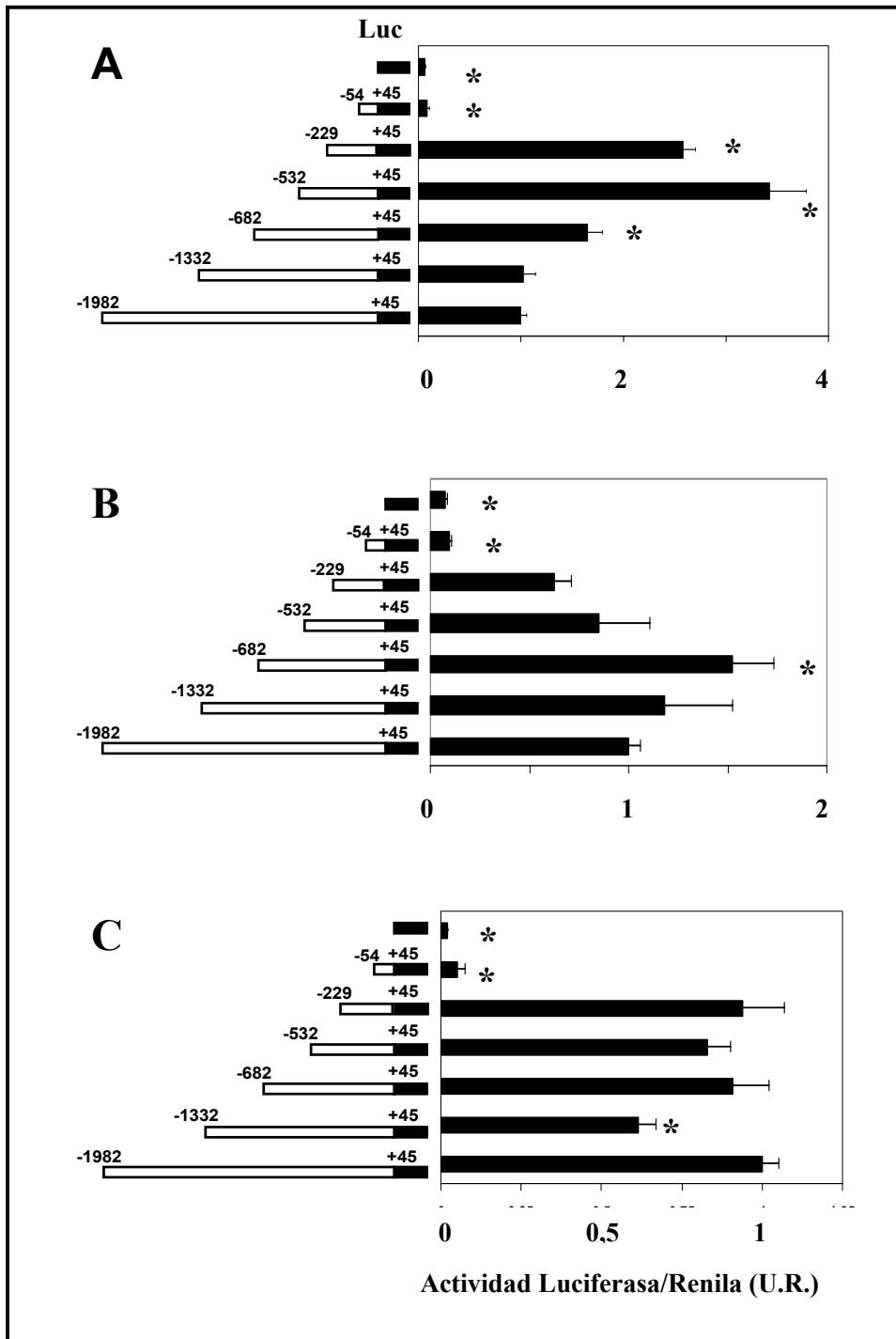
en las células L6E9 o HeLa lo que sugiere que en 10T1/2 se expresan elementos represores capaces de unirse a ésta región, pero que no se expresan en L6E9 o HeLa.



**Figura 8. Sp1 activa al promotor de *Mfn2* y Sp3 lo reprime.** A.- Representación de la región -229/-54 del promotor de *Mfn2* humano. Subrayado se muestra las posibles cajas de unión a Sp predichas por el programa AliBaba2.1. B.- Células 10T1/2 fueron cotransfectadas con la construcción -1982/+45-Luc y un vector de expresión irrelevante (basal) o de Sp1 o de Sp3. Los datos representan la media ± error estándar de tres experimentos realizados por triplicado. \* Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al basal.  $P < 0,05$ .

La pérdida de la región -1982/-682 representó un aumento en la actividad promotora del 50-100% en células L6E9 y 10T1/2, pero no se vio modificada la actividad promotora en

Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético



**Figura 9. Análisis de deleciones del promotor de *Mfn2*.** Se cotransfectaron células 10T1/2 (panel A), L6E9 (panel B) o HeLa (panel C) con el plásmido pRL y la construcción -1982/+45-Luc o deleciones a 5'. La actividad transcripcional corresponde al valor de la actividad luciferasa normalizado por la actividad de la renilla. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto a -1982/+45-Luc.  $P < 0,05$ .

## Resultados

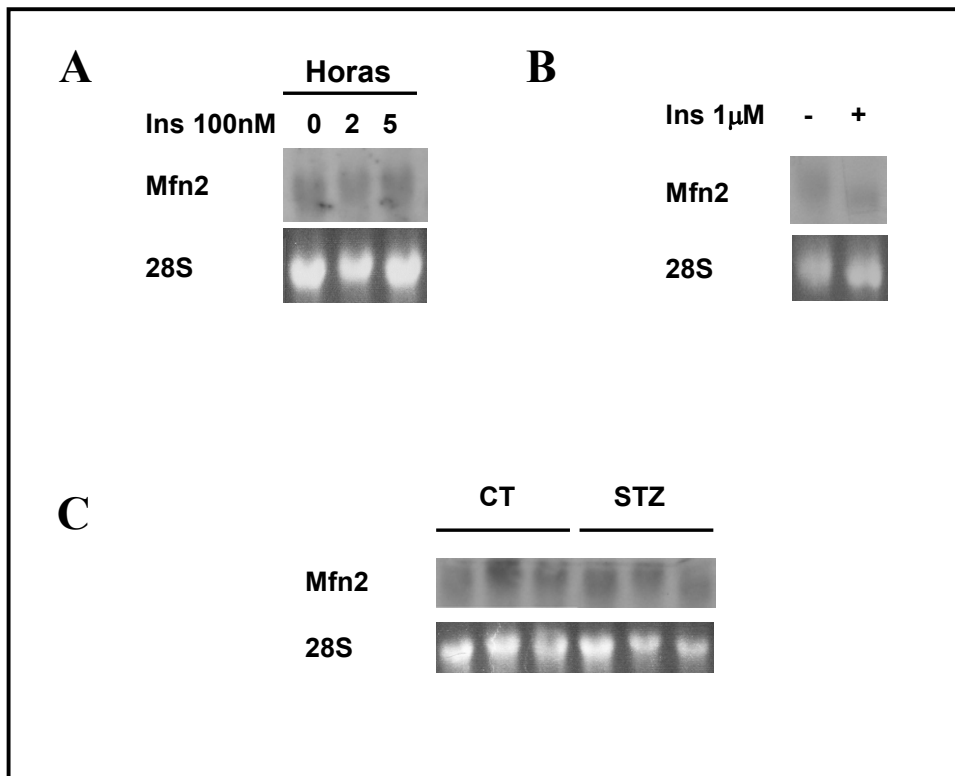
HeLa. En L6E9 deben existir factores activadores que se unen entre -682 y -229 pues la pérdida de este fragmento implica una caída en la actividad luciferasa. Un hecho común a las tres líneas celulares es que, como ya se ha visto en 10T1/2, entre -229 y -54 deben unirse factores que dirigen a la maquinaria basal de transcripción, posiblemente Sp1, pues la pérdida de este fragmento supone una caída en la actividad promotora a los niveles del pGL3-basal.

### **La insulina no regula la transcripción de *Mfn2*.**

La clonación de *Mfn2* se realizó al buscar genes que se expresaban diferencialmente en músculo esquelético en condiciones de resistencia a la insulina (Bach et al, 2003). Para comprobar si la insulina regula la expresión de *Mfn2* se utilizaron cultivos de L6E9 diferenciadas a miotubos. Se extrajo RNA de L6E9 miotubos tratados con insulina 100 nM durante 2 y 5 horas. 18 µg de RNA se analizó por *Northern blot* hibridando con una sonda específica de *Mfn2* sin que se apreciaran diferencias entre las células tratadas y las controles (Fig. 10 A). El tratamiento con 1 µM de insulina durante 48 horas tampoco hizo variar los niveles de transcrito de *Mfn2* (Fig. 10 B). Estos resultados nos indican que *in vitro* la insulina no regula la expresión de *Mfn2*.

La posible regulación *in vivo* se analizó por *Northern blot* a partir de 18 µg de RNA extraído de gastrocnemius de ratas controles o ratas diabéticas por tratamiento con streptozotocina (STZ). Este tratamiento genera un modelo animal de diabetes tipo 1 al destruir las células beta del páncreas. La ausencia de insulina circulante en las ratas tratadas con STZ no supuso cambios en la expresión de *Mfn2* (Fig. 10 C).

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético



**Figura 10. La insulina no regula la transcripción de *Mfn2*.** Células L6E9 fueron diferenciadas a miotubos y tratadas con insulina 100 nM durante 2 o 5 horas (A) o con insulina 1 μM durante 48 horas (B). Se extrajo el RNA y se analizó por *Northern blot*. (C) 18 μg de RNA de músculo gastrocnemius de ratas diabéticas por tratamiento con streptozotocina (STZ) o ratas control (CT) fueron analizados por *Northern blot*. El mRNA de *Mfn2* se detectó mediante una sonda de 1 kb del cDNA de *Mfn2*. La integridad del RNA y como control de carga se utilizó la imagen de la tinción con bromuro de etidio de la subunidad 28S del rRNA en el gel de agarosa.

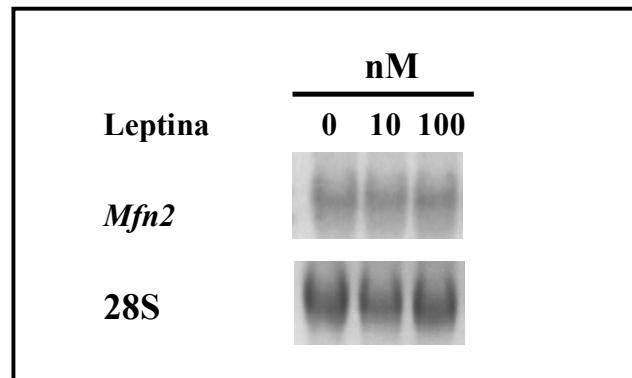
### La leptina no regula *in vitro* la transcripción de *Mfn2* en músculo.

El modelo animal utilizado que permitió la clonación de *Mfn2* fue la rata Zucker obesas *fa/fa*. Estas ratas tienen una mutación en el receptor de la leptina que le impide su activación en respuesta a la leptina. El efecto de la leptina se produce principalmente en el sistema nervioso central, a través del hipotálamo, sin embargo se ha demostrado la señalización directa de la leptina en otros tejidos periféricos (Flier, 2004). La hipótesis que la leptina regula la expresión de *Mfn2* en músculo esquelético se probó tratando células L6E9 miotubos con leptina recombinante murina durante 24 horas y analizando la



## Resultados

expresión de *Mfn2* por *Northern blot* (Fig. 11). Las células musculares tratadas con leptina a 10 o 100 nM no experimentaron cambios en la expresión de *Mfn2*. Este resultado no descarta un papel de la leptina en la expresión de *Mfn2*, pero demuestra la necesidad de utilizar modelos experimentales más complejos.



**Figura 11. La leptina no regula *in vitro* la transcripción de *Mfn2* en músculo.** Células L6E9 fueron diferenciadas a miotubos y tratadas con leptina a 10 o 100 nM durante 24 horas. Se extrajo RNA y se analizó por *Northern blot*. El mRNA de *Mfn2* se detectó mediante una sonda de 1 kb del cDNA de *Mfn2*. La integridad del RNA y como control de carga se utilizó la imagen de la tinción con bromuro de etidio de la subunidad 28S del rRNA en el gel de agarosa.

## Regulación de *Mfn2* por diversos factores de transcripción.

El principal inconveniente de los ensayos con genes reporteros es que un resultado negativo no implica necesariamente que a nivel cromosómico dicho factor no regule la expresión de un gen, ya que dirigiendo al gen reportero sólo se pueden clonar unos pocos kb de un promotor. La ventaja de la técnica es que se permite de modo sencillo determinar el posible papel de un factor de transcripción dado en la regulación de un gen.

Para estudiar el posible papel de factores de transcripción candidatos a regular *Mfn2* se cotransfectaron células 10T1/2 con la construcción -1982/+45-Luc y vectores de expresión de diversos factores de transcripción que podrían actuar sobre el promotor de *Mfn2* (tabla 2).

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

NRF-1 es un factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de un gran número de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales. El programa TESS que busca posibles elementos de unión a factores de transcripción predijo una caja de unión a NRF-1 con homología débil, pero la sobreexpresión de NRF-1 no modificó la actividad luciferasa de -1982/+45-Luc.

De los diversos receptores nucleares (NR) estudiados cabe destacar la fuerte activación de HNF-4 $\alpha$ . HNF-4 $\alpha$  que regula genes relacionados con el metabolismo del colesterol, aminoácidos, lípidos y carbohidratos se expresa abundantemente en hígado, riñón, intestino y páncreas (Giguere, 1999). Riñón e hígado son dos tejidos donde la expresión de *Mfn2* es abundante. El papel de HNF-4 $\alpha$  se debe estudiar para conocer mejor el modo en que se regula la expresión de *Mfn2* en estos tejidos.

A pesar del ligero 50% de incremento en la actividad luciferasa de las células 10T1/2 que sobreexpresan ROR $\alpha$ 2, no se debería excluir la posibilidad de una regulación por ROR $\alpha$ 2 específica de tipo celular, dado que su expresión es elevada en músculo esquelético (Giguere, 1999b).

Los factores de la familia NFAT se han relacionado con la expresión de genes propios del músculo esquelético de contracción lenta (Olson y Williams, 2000; Schiaffino y Serrano, 2002). En las condiciones experimentales utilizadas sólo NFAT4 activó modestamente al promotor de *Mfn2*.

La expresión de *Mfn2* se induce durante la adipogénesis (Bach et al, 2003). C/EBP $\alpha$ , un factor clave en la adipogénesis (Herrera et al., 1989; Lin y Lane, 1992; MacDougald y Lane, 1995), activa al promotor de *Mfn2* en un 63%.

El factor miogénico MyoD activa fuertemente al promotor de *Mfn2*. MEF2 es otro factor miogénico que regula fuertemente la expresión de *Mfn2*. La caracterización de la regulación de *Mfn2* por MEF2 se describe en la tercera sección de resultados.

## Resultados

<b>Basal</b>	<b>1</b>	<b>± 0,05</b>
<b>NRF1</b>	<b>0,86</b>	<b>± 0,08</b>
<b>ROR<math>\alpha</math>2</b>	<b>1,47</b>	<b>± 0,12 *</b>
<b>COUP-TFII</b>	<b>1,35</b>	<b>± 0,21 *</b>
<b>HNF-4<math>\alpha</math></b>	<b>3,21</b>	<b>± 0,38 *</b>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	<b>1,09</b>	<b>± 0,03</b>
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	<b>1,63</b>	<b>± 0,09 *</b>
<b>MyoD</b>	<b>3,85</b>	<b>± 0,89 *</b>
<b>MEF2A</b>	<b>2,7</b>	<b>± 0,28 *</b>
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	<b>3,99</b>	<b>± 0,43 *</b>
<b>NFAT1</b>	<b>0,95</b>	<b>± 0,1</b>
<b>NFAT2</b>	<b>1,08</b>	<b>± 0,12</b>
<b>NFAT4</b>	<b>1,45</b>	<b>± 0,08 *</b>

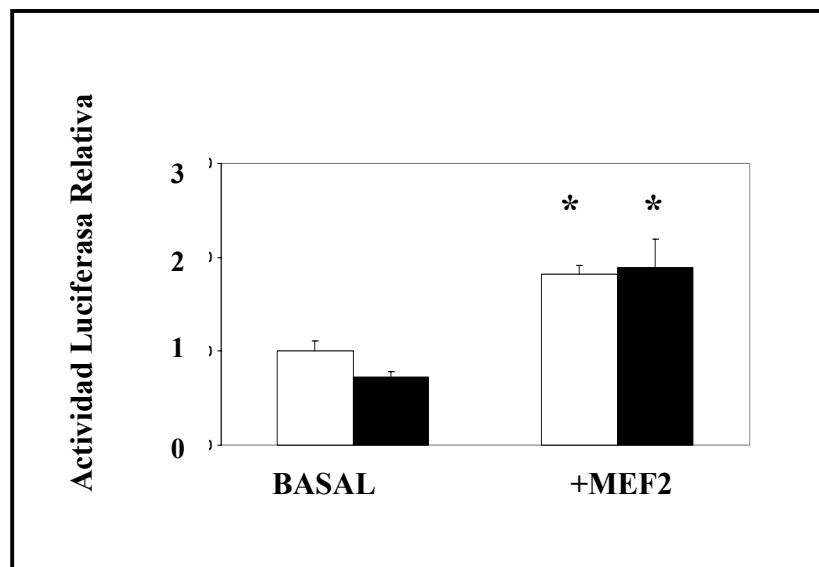
**Tabla 2. Regulación de *Mfn2* por diversos factores de transcripción.** Células 10T1/2 fueron transfectadas con la construcción -1982/+45-Luc (Basal) junto con un vector de expresión irrelevante o con vectores de expresión de los distintos factores de transcripción que aparecen en la tabla. A las 40 horas se determinó la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar relativos al Basal de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado. \* Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al basal.  $P < 0,05$ .

### **MEF2A y NFAT2 no cooperan para activar al promotor de *Mfn2*.**

En el músculo adulto, la isoforma NFAT2 es la que juega un papel más determinante en la transición fibra rápida a fibra lenta (Abbott et al., 1998; Liu et al., 2001). Los miembros de la familia NFAT requieren, posiblemente, la colaboración de otros factores de transcripción para poder ejercer su función activadora (Crabtree y Olson, 2002; Horsley y Pavlath,

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

2002). Una de sus parejas es MEF2 (Blaeser et al., 2000; Chin et al., 1998; Wu et al., 2000). Los ensayos luciferasa con resultado negativo de la capacidad activadora de NFAT2 del promotor de *Mfn2* se realizaron en la línea de fibroblasto murino 10T1/2. Estas células, a diferencia del músculo esquelético, no expresan MEF2. Si NFAT2 para activar al promotor de *Mfn2* necesitase de la cooperación de MEF2 sería lógico el resultado negativo. Se cotransfectó la construcción -1982/+45-Luc junto con vectores de expresión de MEF2A y NFAT2. El ensayo luciferasa no mostró cambios en la actividad transcripcional inducida por MEF2A cuando se cotransfectó junto con el vector de expresión de NFAT2 (Fig. 12).



**Figura 12. MEF2A y NFAT2 no cooperan para activar el promotor de *Mfn2*.** Células 10T1/2 fueron cotransfectadas con la construcción -1982/+45-Luc junto con vectores de expresión de MEF2A, NFAT2 (barras negras) o irrelevante (barras blancas) y sus combinaciones. A las 40 horas se determinó la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de dos experimentos realizados por triplicado. \* Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto a la transfección con el plásmido irrelevante.  $P < 0,05$ .

### NFAT2 necesita la colaboración de de c-Jun para activar al promotor de *Mfn2*.

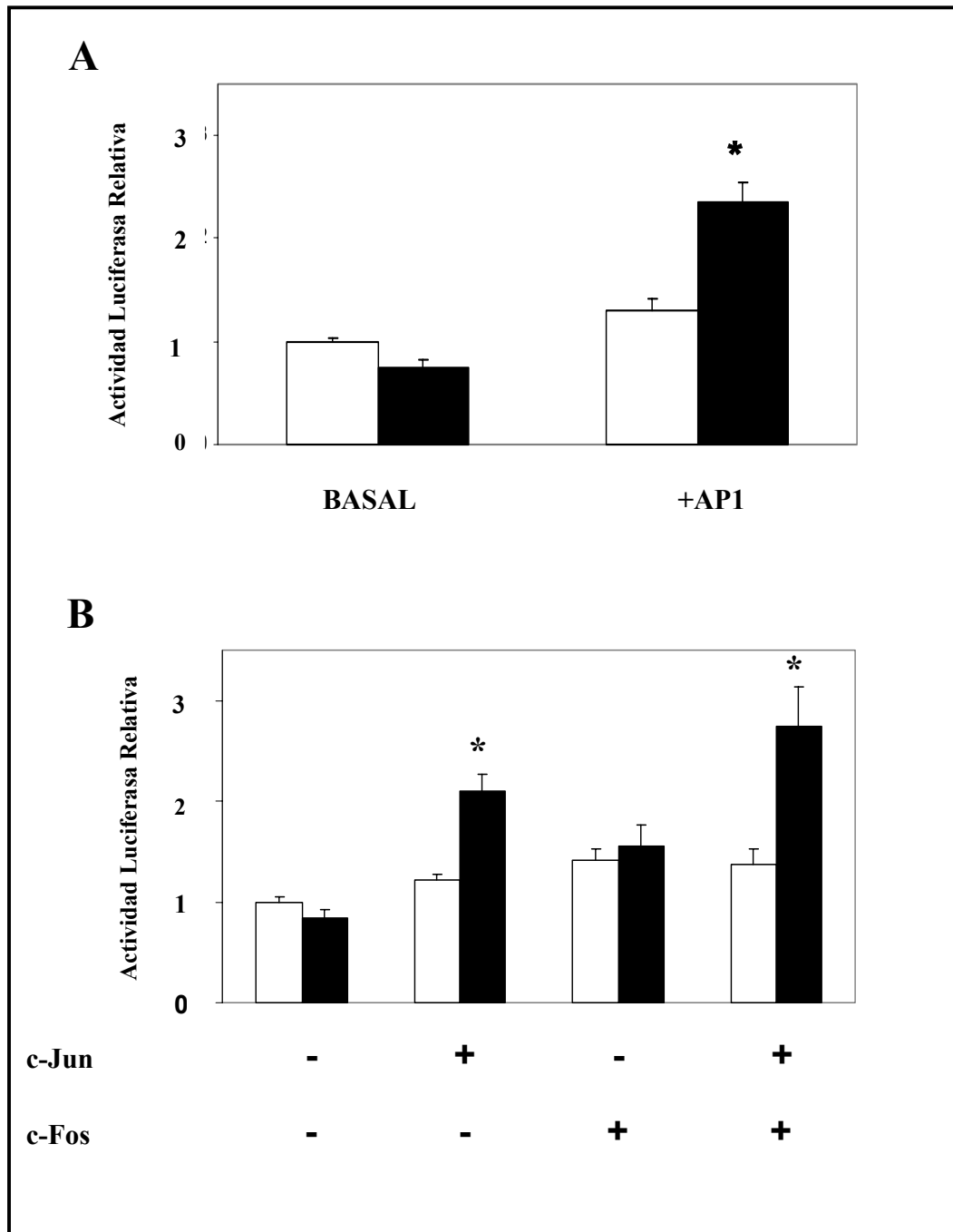
Se ha descrito la cooperación de NFAT con AP-1 en la activación de los genes del sistema inmune (Macian et al., 2001). La posible cooperación entre NFAT2 y AP-1 se testó cotransfectando las 2 kb del promotor de *Mfn2* dirigiendo al gen reportero luciferasa con

## Resultados

los vectores de expresión de NFAT2 y c-Jun y c-Fos como heterodímero AP-1. Los ensayos de actividad luciferasa mostraron que en solitario ni AP-1 ni NFAT2 provocaban ningún efecto significativo sobre el promotor de *Mfn2*, pero cuando se combinaban se producía una inducción de la actividad transcripcional ligeramente superior al doble del basal (Fig. 13 A).

A continuación determinamos si tanto c-Jun como c-Fos eran precisos para producir el efecto activador con NFAT2 o si uno de ellos en solitario era suficiente para producir el mismo efecto. Las diversas combinaciones de cotransfecciones en células 10T1/2 del promotor de *Mfn2* con c-Jun, c-Fos y NFAT2 indicaron que c-Jun era suficiente para producir el efecto activador del promotor de *Mfn2* en colaboración con NFAT2 (Fig. 13 B).

Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético



**Figura 13. NFAT2 colabora con c-Jun para activar el promotor de Mfn2.** Células 10T1/2 fueron cotransfectadas con la construcción -1982/+45-Luc y un vector de expresión irrelevante (barras blancas) o de NFAT2 (barras negras) junto con vectores de expresión para c-Jun y c-Fos (AP-1) (panel A) o en las combinaciones indicadas (panel B). A las 40 horas se determinó la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos realizados por triplicado. \* Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto a la transfección con el plásmido irrelevante.  $P < 0,05$ .

## Resultados

### Reference List

- Abbott, K.L., Friday, B.B., Thaloor, D., Murphy, T.J., and Pavlath, G.K. (1998). Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol. Biol. Cell* 9, 2905-2916.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6-21.
- Blaeser, F., Ho, N., Prywes, R., and Chatila, T.A. (2000). Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J. Biol. Chem.* 275, 197-209.
- Butler, J.E. and Kadonaga, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16, 2583-2592.
- Chin, E.R., Olson, E.N., Richardson, J.A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J.M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* 12, 2499-2509.
- Crabtree, G.R. and Olson, E.N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 *Suppl*, S67-S79.
- Flier, J.S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116, 337-350.
- Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261-282.
- Giguere, V. (1999b). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20, 689-725.
- Giguere, V. (1999a). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20, 689-725.
- Hagen, G., Muller, S., Beato, M., and Suske, G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J.* 13, 3843-3851.
- Herrera, R., Ro, H.S., Robinson, G.S., Xanthopoulos, K.G., and Spiegelman, B.M. (1989). A direct role for C/EBP and the AP-1-binding site in gene expression linked to adipocyte differentiation. *Mol. Cell Biol.* 9, 5331-5339.
- Horsley, V. and Pavlath, G.K. (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biol.* 156, 771-774.
- Lin, F.T. and Lane, M.D. (1992). Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev.* 6, 533-544.
- Liu, Y., Cseresnyes, Z., Randall, W.R., and Schneider, M.F. (2001). Activity-dependent nuclear translocation and intranuclear distribution of NFATc in adult skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* 155, 27-39.
- MacDougald, O.A. and Lane, M.D. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 64:345-73., 345-373.

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

Macian,F., Lopez-Rodriguez,C., and Rao,A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476-2489.

Majello,B., De Luca,P., Hagen,G., Suske,G., and Lania,L. (1994). Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 22, 4914-4921.

Olson,E.N. and Williams,R.S. (2000). Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* 101, 689-692.

Schiaffino,S. and Serrano,A. (2002). Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 569-575.

Smale,S.T. (1997a). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1351, 73-88.

Smale,S.T. (1997b). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1351, 73-88.

Smale,S.T. and Kadonaga,J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 449-479.

Suske,G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238, 291-300.

Wu,H., Naya,F.J., McKinsey,T.A., Mercer,B., Shelton,J.M., Chin,E.R., Simard,A.R., Michel,R.N., Bassel-Duby,R., Olson,E.N., and Williams,R.S. (2000). MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J.* 19, 1963-1973.



## **2. Mfn2 MEDIA EL EFECTO ESTIMULADOR DE PGC-1 $\alpha$ SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.**

Ratas Zucker obesas expresan un 40% menos mRNA de *Mfn2* en músculo esquelético que ratas Zucker control (Bach et al., 2003). En humanos se vio un descenso similar en la expresión de *Mfn2* en individuos obesos respecto a controles sanos con normopeso, de manera que los niveles de expresión de *Mfn2* presentan una correlación negativa con el índice de masa corporal (Bach et al., 2003).

Estudios de expresión de *Mfn2* en diferentes tejidos mostraron mayores niveles de mRNA en corazón, músculo esquelético, cerebro, riñón e hígado. Tejidos, todos ellos, con elevadas necesidades energéticas (Bach et al., 2003).

La represión de la expresión de *Mfn2* en células musculares mediante adenovirus antisentido resultó en una caída del potencial de membrana mitocondrial, el consumo de oxígeno, la oxidación de piruvato, glucosa y palmitato mientras que con la sobreexpresión de *Mfn2* se incrementó el potencial de membrana mitocondrial y la oxidación de glucosa (Bach et al., 2003 ; S. Pich, 2004).

Todos estos datos en conjunto indican que Mfn2 podría estar implicada en la homeostasis energética. De ser cierta esta hipótesis se esperaría un incremento de la expresión de *Mfn2* en aquellas condiciones donde el gasto energético se viese incrementado. El objetivo de esta sección fue estudiar los cambios en la expresión de *Mfn2* en músculo esquelético condiciones de de mayor consumo energético y el análisis del mecanismo molecular por el que se producen.

## Resultados

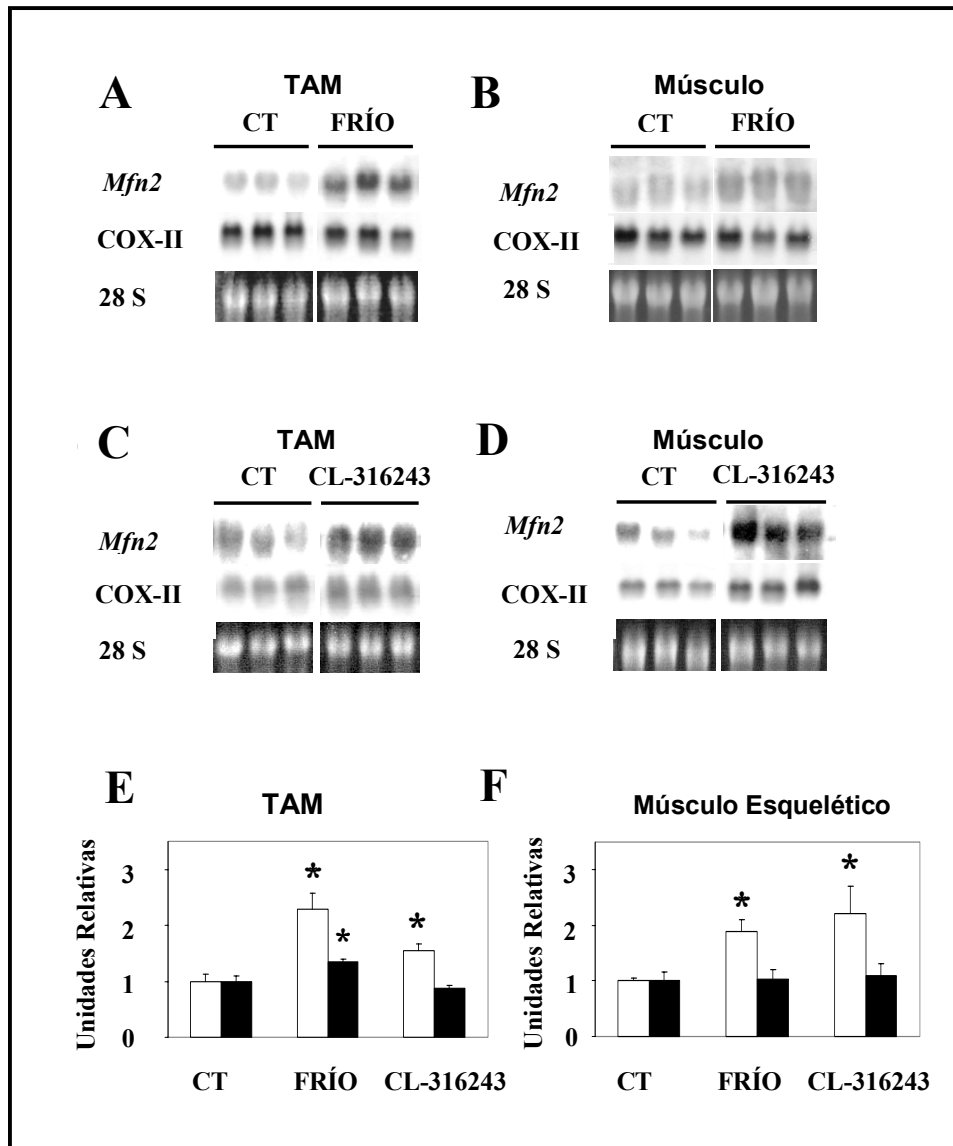
### **La expresión de *Mfn2* aumenta en músculo esquelético y tejido adiposo marrón (TAM) en condiciones de gasto energético incrementado.**

Variaciones de la expresión de *Mfn2* en condiciones de mayor gasto energético proporcionarían una evidencia adicional del papel de *Mfn2* en la homeostasis energética. La exposición al frío es un tratamiento clásico para incrementar el consumo energético del organismo. El mantenimiento de la temperatura corporal en estas condiciones implica la puesta en marcha de los mecanismos de respuesta termogénica entre los cuales está la disipación en forma de calor del potencial de membrana mitocondrial generado por el bombeo de protones al exterior de la matriz mitocondrial (Lowell y Spiegelman, 2000).

Con este objetivo, se expusieron 5 ratas Wistar a 4°C durante 48 horas o bien fueron mantenidas a temperatura ambiente (grupo control). Transcurrido este tiempo los animales fueron sacrificados y el TAM y el músculo esquelético, los dos principales tejidos termogénicos en mamíferos, fueron procesados para extraer el RNA. Se determinó la expresión del transcrito de *Mfn2* mediante *Northern blot*, usando una sonda específica (Bach et al., 2003). El TAM y el músculo esquelético de los animales expuestos al frío mostraron una inducción de *Mfn2* de 2,4 y 2,0 veces, respectivamente (Fig. 14). Dado que el frío también provoca el incremento de la masa mitocondrial. Las mismas membranas se hibridaron con una sonda específica del citocromo oxidasa II (COX-II), una proteína mitocondrial que es codificada por el genoma mitocondrial. La expresión de COX-II no varió en músculo mientras que en TAM se produjo un aumento del 30%. Este aumento es muy inferior al observado en *Mfn2* (Fig. 14) lo que indica que el aumento de *Mfn2* se produce de manera específica como respuesta al frío y no se trata de un hecho indirecto debido al aumento de la masa mitocondrial.

La señal de frío es comunicada al TAM y al músculo esquelético por el sistema nervioso simpático (Lowell y Spiegelman, 2000), en consecuencia, el tratamiento con agonistas  $\beta$ -adrenérgicos provoca comportamiento energético similar a la exposición al frío (Landsberg et al., 1984). Por ello se utilizó el agonista específico  $\beta$ -3-adrenérgico CL-316243 (Boss et al., 1999) dado que parece ser que este isotipo de receptor adrenérgico es el que juega un papel más determinante en la señalización de la sensación de frío del cerebro al TAM (Lowell y Spiegelman, 2000). Se administró CL-316243 (1 mg/kg corporal) por inyección

Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético



**Figura 14. La expresión de *Mfn2* aumenta en músculo esquelético y TAM en condiciones de gasto energético incrementado.** Se realizaron ensayos de *Northern blot* a partir de 18  $\mu$ g de RNA de TAM o músculo esquelético de ratas Wistar control o expuestas a 4°C durante 48 horas ( paneles A y B) o tratadas con CL-316243 (1 mg/Kg) durante 24 horas (panel C) o durante 7 días (1 mg/kg\*día) (panel D). El mRNA de *Mfn2* se detectó mediante una sonda de 1 kb del cDNA de *Mfn2*. El mRNA de COX-II se utilizó como estimación de la expresión de genes mitocondriales. La integridad del RNA y como control de carga se utilizó la imagen de la tinción con bromuro de etidio de la subunidad 28S del rRNA en el gel de agarosa. Representación gráfica de los valores del análisis densitométrico del mRNA de *Mfn2* (columnas blancas) o COX-II (columnas negras) en el TAM (panel E) y músculo esquelético (panel F). \* indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al mRNA del grupo control.  $p < 0,05$ .

## Resultados

intraperitoneal a 5 ratas Wistar y al grupo control se le administro suero salino. A las 24 horas de la administración los animales fueron sacrificados y se obtuvo mRNA del TAM y del músculo esquelético. La expresión de *Mfn2* se determinó mediante *Northern blot* en los citados tejidos observándose un incremento de un 60% en la expresión de *Mfn2* en el TAM de los animales tratados con CL-316243 sin que hubiese modificación en la expresión de COX-II cambios en la expresión de *Mfn2* en músculo esquelético (resultados no mostrados), resultado que concuerda con la ausencia de receptores  $\beta$ -3-adrenérgicos en músculo esquelético La administración durante 7 días de CL-316243 (1 mg/dia\*Kg peso) resultó en una fuerte inducción de *Mfn2* en músculo esquelético (Fig. 14 D y F) posiblemente por un mecanismo indirecto determinante en la respuesta al frío a largo plazo.

### **El coactivador PGC-1 $\alpha$ regula la expresión de *Mfn2* en músculo.**

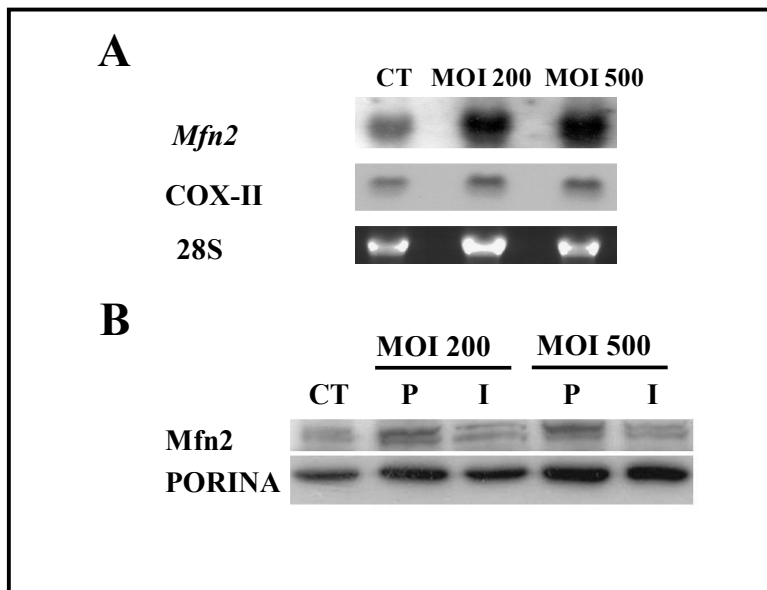
Durante la respuesta al frío se activa el programa termogénico lo cual requiere una transcripción coordinada y precisa de un conjunto de genes. El coactivador PGC-1 $\alpha$  se ha demostrado ser un director del programa termogénico (Puigserver et al., 1998).

Los resultados anteriores demuestran que *Mfn2* aumenta su expresión en condiciones de mayor gasto energético y en concreto en condiciones donde se activa el programa termogénico. A continuación, nos planteamos si PGC-1 $\alpha$  podía estar regulando la expresión génica de *Mfn2*. Dado que la expresión de PGC-1 $\alpha$  es muy débil en líneas celulares de músculo (Wu et al., 1999) procedimos a analizar el efecto de la sobreexpresión de PGC-1 $\alpha$  sobre la expresión de *Mfn2*. Así, miotubos L6E9 se infectaron con 200 y 500 unidades infectivas de adenovirus que codifican para PGC-1 $\alpha$ . A las 48 horas de la infección se extrajo el RNA y por *Northern blot* se observó una potente inducción de *Mfn2* muy superior a la observada de COX-II (Fig. 15 A) en las células que sobreexpresaban PGC-1 $\alpha$ .

Para comprobar que el incremento en mRNA de *Mfn2* en las células musculares que sobreexpresan PGC-1 $\alpha$  se traducían en un incremento en los niveles de proteína, los miotubos L6E9 se infectaron con el adenovirus codificante para PGC-1 $\alpha$  y como control - para excluir la posibilidad de que la inducción en la expresión de *Mfn2* fuese debido a un

### Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

efecto indirecto de la infección- con un adenovirus irrelevante que codifica para  $\beta$ -Galactosidasa con las mismas unidades infectivas utilizadas en el experimento de *Northern blot*, 200 y 500. A las 72 horas de la infección se procedió al fraccionamiento subcelular de las células musculares. Se purificó la fracción mitocondrial y se detecto la abundancia de Mfn2 en ensayos de *Western blot*. Los resultados obtenidos indicaban que existía incremento en la expresión de Mfn2 en las mitocondrias de las células que sobreexpresaban PGC-1 $\alpha$  respecto a las células no infectadas o infectadas con un adenovirus irrelevante (Fig. 15 B). Como control de carga se utilizó la proteína mitocondrial porina. Esto nos permitió concluir que PGC-1 $\alpha$  aumenta la expresión génica de Mfn2 y que este aumento se traduce en un aumento de los niveles de proteína, siendo este aumento muy superior al incremento de la masa mitocondrial. En otras palabras, una mayor expresión de PGC-1 $\alpha$  implica que por unidad de masa mitocondrial la cantidad de Mfn2 presente en la mitocondria aumente, tal vez, por regulación a nivel transcripcional.



**Figura 15. El coactivador PGC-1 $\alpha$  regula la expresión de Mfn2 en células musculares.** A.- Detección del mRNA de *Mfn2* por *Northern blot* de L6E9 miotubos control (CT) o infectados con las unidades infectivas indicadas (MOI) de un adenovirus codificante para PGC-1 $\alpha$ . El mRNA de COX-II se utilizó como estimación de la expresión de genes mitocondriales. La integridad del RNA y como control de carga se utilizó la imagen de la tinción con bromuro de etidio de la subunidad 28S del rRNA en el gel de agarosa. B.- *Western blot* de la fracción mitocondrial de L6E9 miotubos control (CT) o infectadas con adenovirus codificante para PGC-1 $\alpha$  (P) o un adenovirus irrelevante (I). Como control de carga se utilizó la proteína porina.

## Resultados

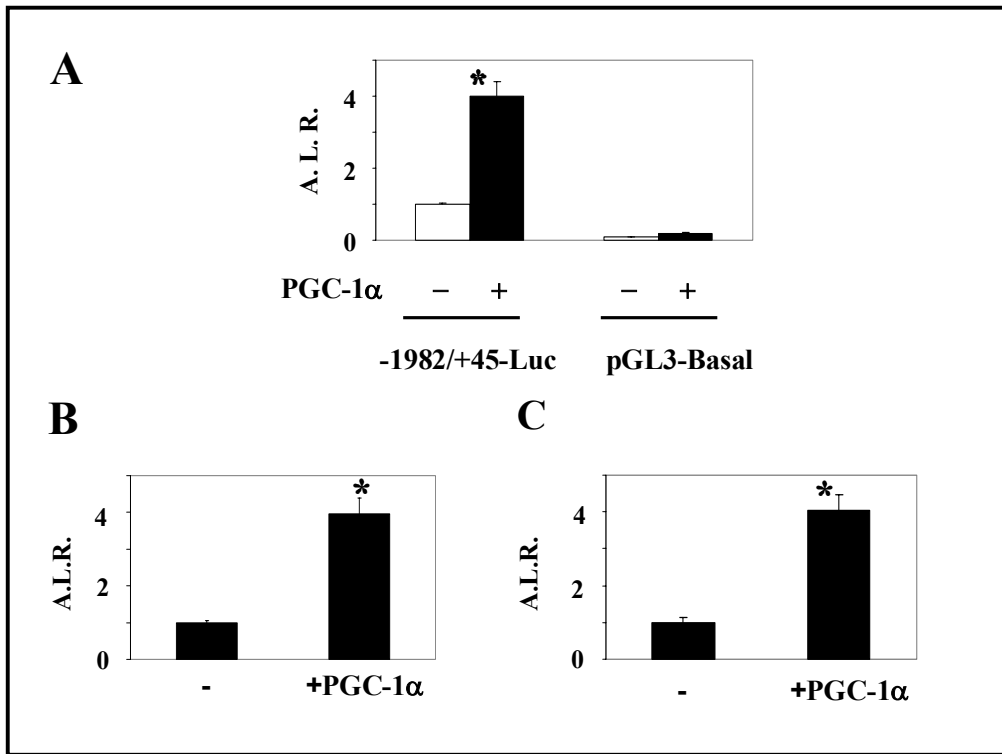
### **PGC-1 $\alpha$ actúa sobre el promotor humano de *Mfn2*.**

Para analizar el posible papel de PGC-1 $\alpha$  en la regulación transcripcional de *Mfn2* cotransfectamos en fibroblastos 10T1/2 el plásmido pGL3 basal o el plásmido conteniendo la región comprendida entre -1982 y +45 del gen de *Mfn2* humano dirigiendo la expresión del gen reportero luciferasa (-1982/+45-Luc) junto con un vector de expresión para PGC-1 $\alpha$ . Los ensayos de actividad luciferasa, como medida indirecta de transcripción, demostraron un incremento de 4 veces en la actividad transcripcional del promotor de *Mfn2* cuando se cotransfectaba con el vector de expresión para PGC-1 $\alpha$  respecto a la cotransfección junto con el vector de expresión pCDNA3 basal, esto es, sin inserto (Fig. 16 A). Este incremento en la actividad transcripcional se debe a secuencias específicas del promotor humano de *Mfn2* pues la cotransfección de pGL3-basal, sin la presencia de ningún tipo de promotor que dirija la expresión del gen de la luciferasa, junto con el vector de expresión para PGC-1 $\alpha$  no produjo cambios significativos en la actividad luciferasa residual del pGL3-basal (Fig. 16 A).

El mismo resultado se observó cuando las cotransfecciones se realizaron en las líneas celulares HeLa (Fig. 16 B) y L6E9 (Fig. 16 C) por lo que se optó en los sucesivos estudios utilizar la línea celular 10T1/2 para mapear la región del promotor de *Mfn2* humano sobre la que actúa PGC-1 $\alpha$ . Los motivos que nos hicieron seleccionar esta línea celular fueron los siguientes: a) es de cultivo sencillo, b) se transfecta con alta eficiencia y c) al igual que en las líneas musculares, PGC-1 $\alpha$  actúa como coactivador del promotor humano de *Mfn2*.

### **PGC-1 $\alpha$ actúa sobre la región del promotor humano de *Mfn2* comprendida entre las bases -532 y -229.**

PGC-1 $\alpha$  inicialmente se clonó como un coactivador de receptores nucleares de hormonas (Puigserver et al., 1998), ya en este primer trabajo se observó que PGC-1 $\alpha$  poseía diversos dominios y dependiendo del dominio con el que interaccionaba con el NR ésta era dependiente o no de ligando. Trabajos posteriores demostraron que PGC-1 $\alpha$  era un coactivador promiscuo, coactivando no sólo a NR sino que también a otros factores de



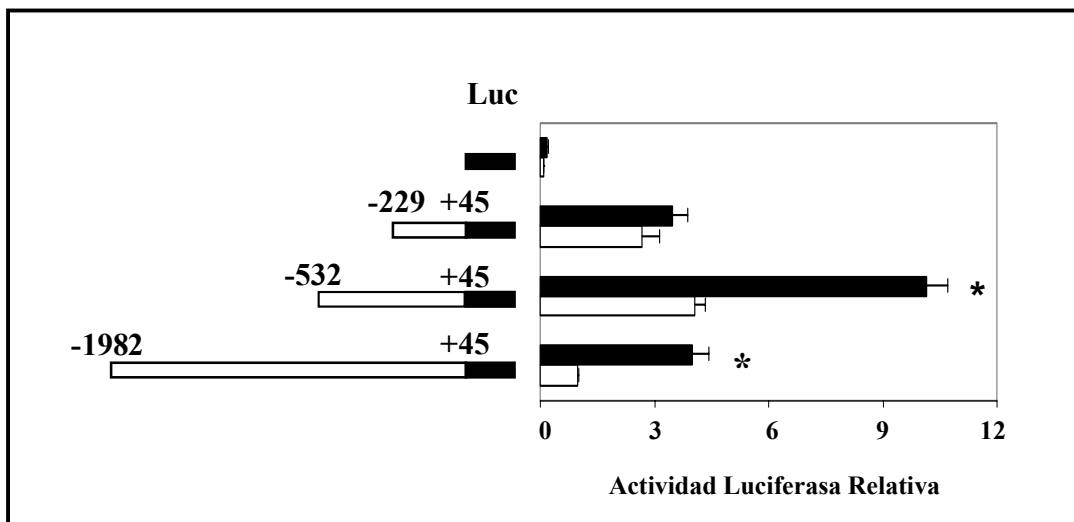
**Figura 16.- PGC-1 $\alpha$  estimula la actividad del promotor *Mfn2*.** A.- Se transfectaron fibroblastos 10T1/2 con el plásmido -1982/+45-Luc o pGL3-basal junto con un vector de expresión para PGC-1 $\alpha$  (barras negras) o un vector de expresión irrelevante (barras blancas) y se determinó la actividad luciferasa como medida de la actividad transcripcional. Células HeLa (panel B) o L6E9 (panel C) se transfectaron con el plásmido -1982/+45-Luc junto con un vector de expresión irrelevante o con un vector de expresión para PGC-1 $\alpha$  y se determinó la actividad luciferasa. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 a 5 experimentos realizados por triplicado.\* indica una diferencia estadísticamente significativa debida a PGC-1 $\alpha$ ,  $p < 0,05$ .

transcripción de familia distinta como MEF2, FOXO o NRF1 (Michael et al., 2001; Puigserver et al., 2003; Wu et al., 1999). Esto obligó a mapear detalladamente la región del promotor de *Mfn2* sobre la que actuaba PGC-1 $\alpha$  dado que eran muchos los factores que podían ser coactivados por PGC-1 $\alpha$  y no se podía excluir que dicho factor fuese alguno aún no descrito.

Se cotransfectó el vector de expresión para PGC-1 $\alpha$  junto con diversas deleciones a 5' del promotor humano de *Mfn2* dirigiendo la actividad del gen reportero de la luciferasa. Los ensayos de actividad luciferasa indicaron que la construcción con la secuencia comprendida

## Resultados

entre -532 y +45 mantenía un fuerte aumento en su actividad transcripcional al ser cotransfectado con el vector de expresión para PGC-1 $\alpha$  y que dicho aumento en la actividad promotora desaparecía cuando la secuencia que dirigía la transcripción del gen de la luciferasa comprendía las bases entre -229 y +45 (Fig. 17). Así pues, entre las bases -532 y -229 se debía unir un factor de transcripción al cual se uniría PGC-1 $\alpha$  para aumentar la actividad transcripcional en el promotor de *Mfn2*.



**Figura 17. PGC-1 $\alpha$  actúa sobre la región del promotor humano de *Mfn2* comprendida entre las bases -532 y -229.** Actividad transcripcional de deleciones a 5' del promotor de *Mfn2* transfectados en células 10T1/2 junto con un vector de expresión irrelevante (barras blancas) o un vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  (barras negras). Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 a 5 experimentos realizados por triplicado.\* indica una diferencia estadísticamente significativa debida a PGC-1 $\alpha$ ,  $p < 0,05$ .

### **PGC-1 $\alpha$ actúa sobre la región del promotor humano de *Mfn2* comprendida entre las bases -439 y -352.**

El fragmento de 303 bp delimitado en el apartado anterior continuaba siendo demasiado grande. Optamos por aplicar dos nuevas estrategias que nos permitirían confirmar los resultados anteriores y delimitar mejor la región donde actúa PGC-1 $\alpha$ . En primer lugar utilizando la construcción del promotor -1982/+45 eliminamos pequeños fragmentos intermedios del promotor (Fig. 18 A) conservando el resto de la secuencia. Esto permitió



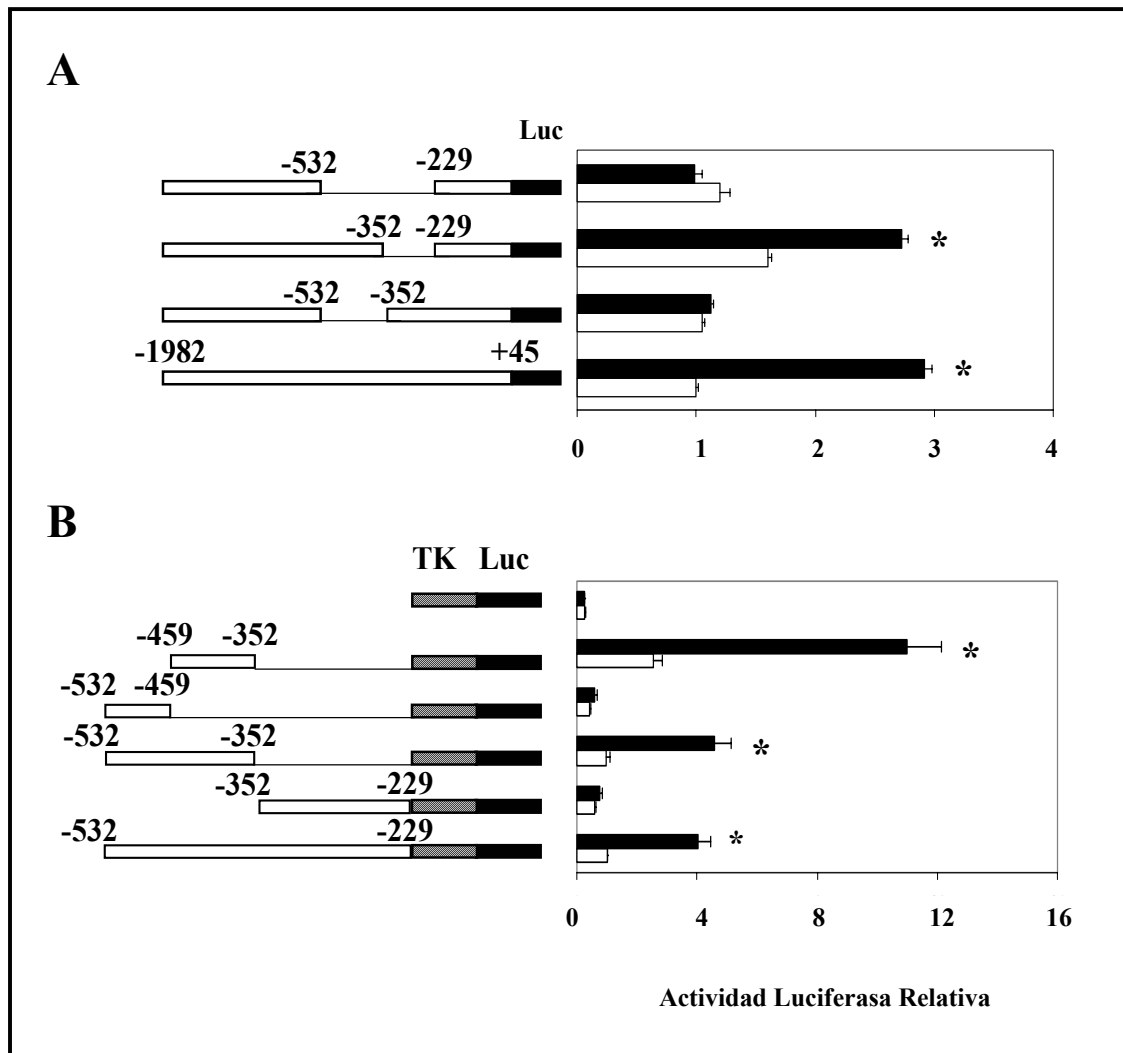
determinar, de acuerdo con el resultado anterior, que en el contexto de las 2 kb a 5' del inicio de transcripción del gen de *Mfn2* humano la eliminación de la secuencia comprendida entre -532 y -229 comportaba la pérdida del efecto coactivador de PGC-1 $\alpha$  (Fig. 18 A), pero la eliminación del fragmento comprendido entre -352 y -229 continuaba mostrando activación por PGC-1 $\alpha$  y no era así si el fragmento eliminado comprendía la secuencia entre -532 y -352.

La siguiente estrategia consistió en colocar a modo de *enhancer* fragmentos cortos del promotor de *Mfn2* en un vector pGL3 dirigido por el promotor débil de la timidina quinasa (TK) (Fig. 18 B). Esto ofrecía dos ventajas, por una parte favorecía la estrategia de generación de nuevas construcciones y por otra reducía el posible *background* debido a la posibilidad de que PGC-1 $\alpha$  incrementase los niveles de un determinado factor de transcripción y que éste actuase sobre el promotor de *Mfn2* sin la necesidad de interactuar con PGC-1 $\alpha$ .

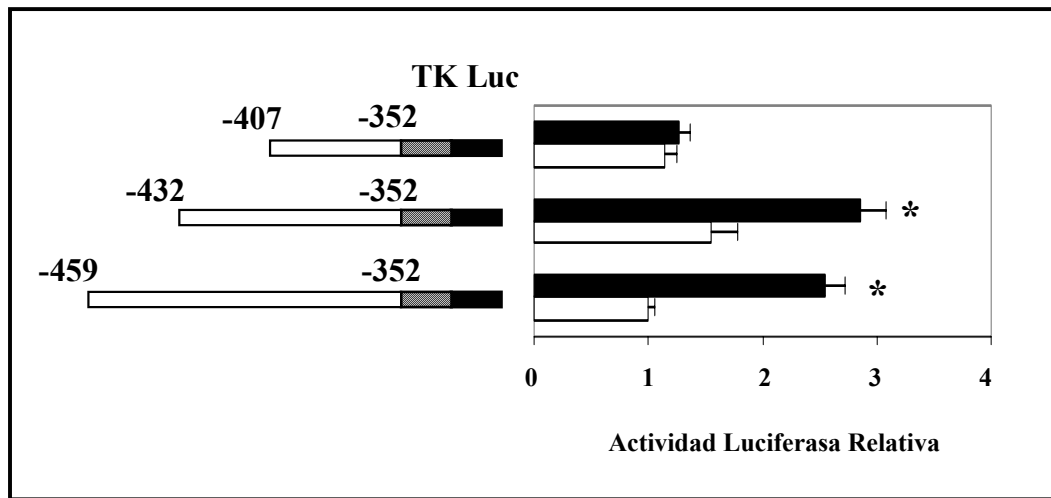
El uso de las construcciones dirigidas por el promotor de la TK permitió confirmar que entre -532 y -352 se halla la región donde actúa PGC-1 $\alpha$  (Fig. 18 B). Si el fragmento que se colocaba a modo de *enhancer* contenía la secuencia entre -532 y -459 no se producía ningún tipo de activación al cotransfectarse con PGC-1 $\alpha$ , pero si el fragmento colocado a 5' del promotor de la TK contenía la secuencia entre -459 y -352 se obtenía una fuerte activación transcripcional (Fig. 18 B).

### **Se requiere la secuencia entre -432 y -407 para la coactivación por PGC-1 $\alpha$ .**

La producción de nuevas construcciones que permitiesen una mayor delimitación de la secuencia donde actuaba PGC-1 $\alpha$  requirió generar nuevas dianas de restricción mediante mutagénesis dirigida. De este modo se pudo determinar en 25 bp la secuencia requerida por PGC-1 $\alpha$  para ejercer su actividad como coactivador. Delecciones a 5' de la construcción dirigida por el promotor de la TK y con el fragmento comprendido entre -459 y -352 mostraron que cuando se eliminaba la secuencia entre -459 y -432 PGC-1 $\alpha$  continuaba ejerciendo su efecto, pero la eliminación de la secuencia entre -432 y -407 implicaba una no activación por el coactivador (Fig. 19 ).



**Figura 18.** PGC-1 $\alpha$  actúa sobre la región del promotor humano de *Mfn2* comprendida entre –439 y –352. A.- Actividad transcripcional de las construcciones del promotor de *Mfn2* transfectadas en células 10T1/2 junto con un vector de expresión irrelevante (barras blancas) o un vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  (barras negras). B.- Actividad transcripcional de fragmentos del promotor humano de *Mfn2* colocados a modo de *enhancer* en TK-Luc transfectados en células 10T1/2 junto con un vector de expresión irrelevante (barras blancas) o un vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  (barras negras). Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.\* indica una diferencia estadísticamente significativa debida a PGC-1 $\alpha$ ,  $p < 0,05$ .

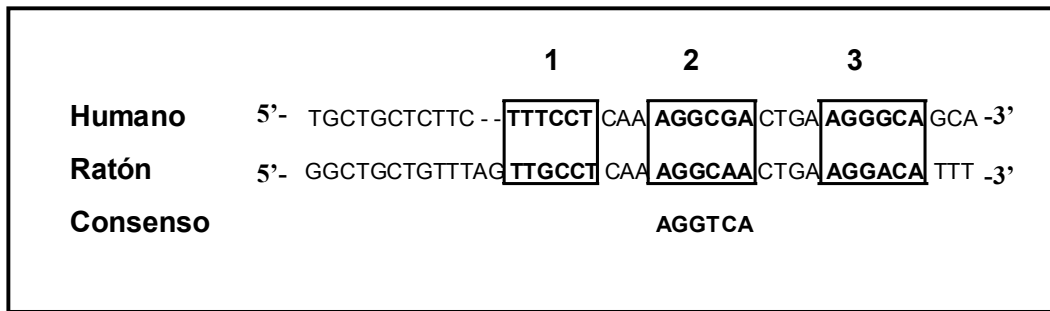


**Figura 19. Se requiere la secuencia entre -432 y -407 para la coactivación por PGC-1 $\alpha$ .** Mediante mutagénesis dirigida se obtuvieron deleciones a 5' de la construcción -459/-352-TK-Luc que se transfectaron en células 10T1/2 junto con un vector de expresión irrelevante (barras blancas) o un vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  (barras negras). Se determinó la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.\* indica una diferencia estadísticamente significativa debida a PGC-1 $\alpha$ ,  $p < 0,05$ .

**La región donde actúa PGC-1 $\alpha$  está altamente conservada y contiene 3 cajas de unión para NR.**

El alineamiento de la secuencia entre -432 y -395 del promotor humano de *Mfn2* con su secuencia equivalente de ratón mostró que esta secuencia estaba altamente conservada (Fig. 20), denotando su importancia. La observación detallada de dicha secuencia reveló 3 posibles elementos de respuesta a hormonas (HRE) conservados entre el gen humano y el de ratón donde se unen los NR (Fig. 20).

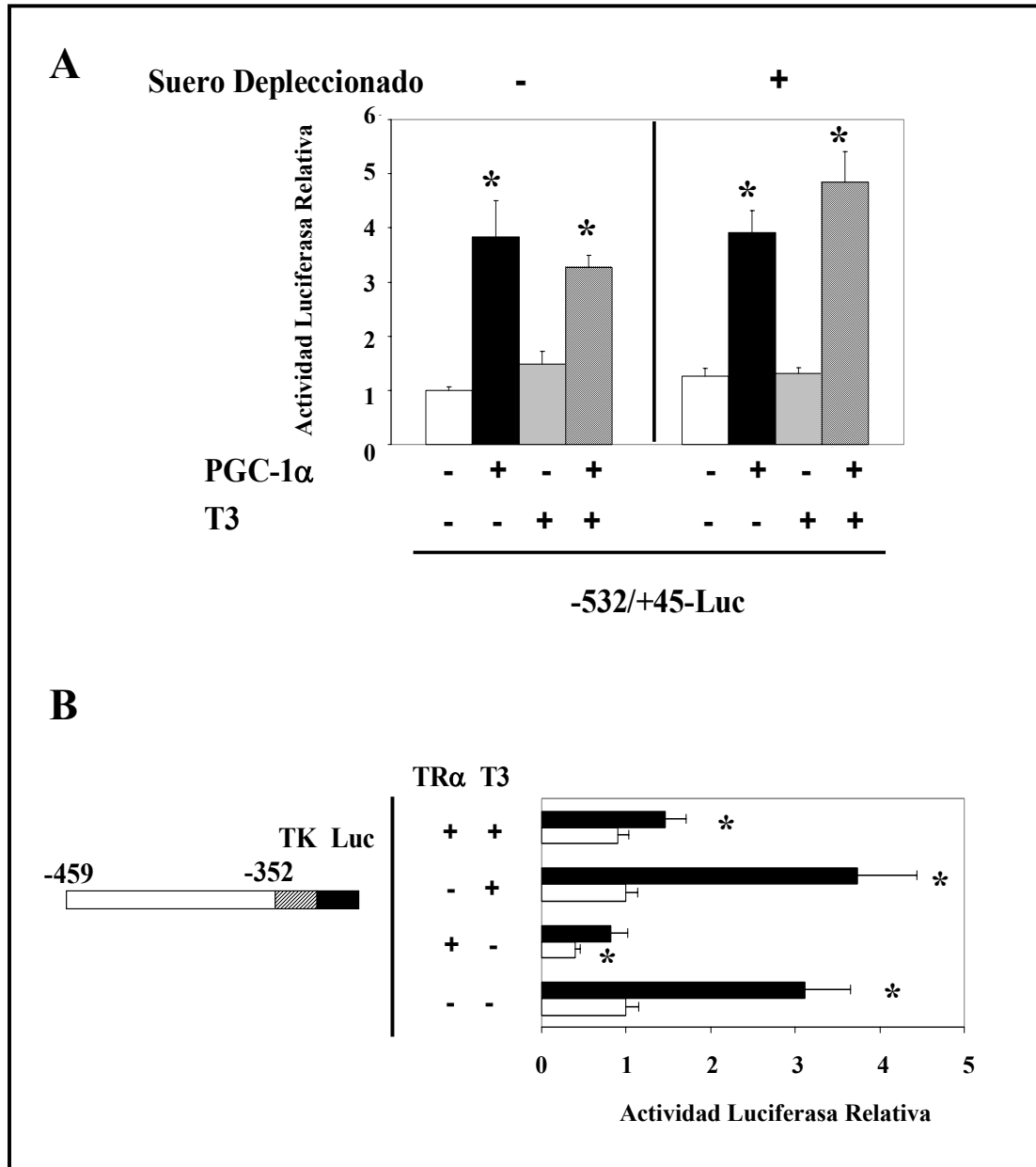
## Resultados



**Figura 20.** La región -432/-407, donde actúa PGC-1 $\alpha$ , está altamente conservada y contiene 3 cajas de unión para NR. Alineamiento de la secuencia humana comprendida entre -432/-395 del gen humano de *Mfn2* con su equivalente en ratón. Encuadrado se muestran 3 elementos de respuesta a hormonas altamente conservados.

### **El receptor de hormona tiroidea (TR) no es responsable de la activación transcripcional de PGC-1 $\alpha$ en el promotor de *Mfn2*.**

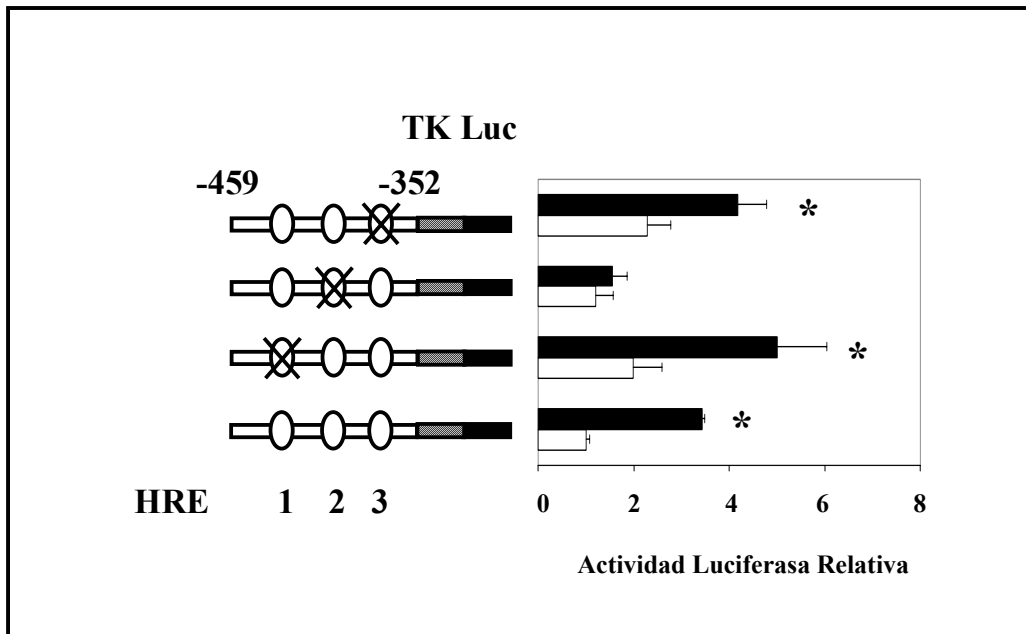
Los NR suelen unirse como homo- o heterodímeros y la separación y orientación de los HRE determinan cual de los miembros de la familia de los NR se une (Giguere, 1999). En la secuencia donde se mapó que actúa PGC-1 $\alpha$  en el promotor de *Mfn2* se hallan conservados 3 posibles HRE formando dos de ellas un DR4, es decir una repetición directa (cabeza-cola) separada cada caja por 4 bp. Este tipo de separación ha sido una de las más estudiadas por ser allí donde se unen el TR (Glass, 1994). Se ha propuesto un papel relevante de TR en la respuesta termogénica (al Adsani et al., 1997), siendo uno de los primeros factores de transcripción que se demostró que era coactivado por PGC-1 $\alpha$  de modo dependiente de ligando (Puigserver et al., 1998). Estos datos nos llevaron a determinar si TR era el factor al cual coactivaba PGC-1 $\alpha$  en el promotor de *Mfn2*. La construcción -532/+45-Luc fue cotransfectada en presencia o ausencia de hormona tiroidea T3 tanto en medio habitual como con medio con suero depleccionado de hormona (véase materiales y métodos). Sorprendentemente la presencia de T3 tanto en medio habitual como depleccionado no tuvo ningún efecto sobre el papel activador de PGC-1 $\alpha$  (Fig. 21 A). Para excluir la posibilidad de que la falta de efecto de T3 fuese debido a unos bajos niveles endógenos de TR, cotransfectamos la construcción con el promotor de la TK con la secuencia -459/-352 a modo de *enhancer* (-459/-352-TK-Luc) con o sin un vector de



**Figura 21. El receptor de la hormona tiroidea (TR $\alpha$ 1) no es responsable de la activación transcripcional de PGC-1 $\alpha$  en el promotor de *Mfn2*.** A.- Células 10T1/2 cultivadas con en un medio con suero deplecionado de hormona o normal fueron transfectadas con la construcción -532/+45-Luc y con un vector de expresión irrelevante o un vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  y se trató durante 24 horas con 100nM T3 o el vehículo. B.- La construcción -459/-352-TK-Luc se cotransfectó en células 10T1/2 con un vector de expresión irrelevante (barras blancas), un vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  (barras negras) y un vector de expresión de TR $\alpha$ 1 combinados como se indica y se trato con 100nM T3 o el vehículo en un medio con suero deplecionado de hormona. Se determinó la actividad luciferasa. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.\* indica una diferencia estadísticamente significativa respecto a la construcción -532/+45-Luc o -459/-352-TK-Luc.  $p < 0,05$ .

## Resultados

expresión codificante para TR $\alpha$ 1 en presencia o ausencia de T3 en un medio deplecionado de hormona tiroidea (Fig. 21 B). Los resultados obtenidos nos confirmaron que el efecto de PGC-1 $\alpha$  sobre el promotor de *Mfn2* no era debido a la coactivación de TR. En las condiciones experimentales utilizadas se observó que la sobreexpresión de TR afectaba a la actividad promotora de -459/-352-TK-Luc. Ante la ausencia de ligando su efecto fue represor, anulando la actividad activadora de PGC-1 $\alpha$ . Al añadir T3 no hubo ningún efecto sobre la actividad de la construcción basal, pero anuló el efecto activador de PGC-1 $\alpha$  posiblemente al impedir la unión al promotor del factor al cual coactiva o bien el secuestro de PGC-1 $\alpha$  por TR $\alpha$ 1.



**Figura 22. La HRE 2 es necesaria para el efecto coactivador de PGC-1 $\alpha$ .** Células 10T1/2 se transfectaron con la construcción -459/-352-TK-Luc salvaje o mutaciones en cada uno de los HRE junto con un vector de expresión irrelevante (barras blancas) o un vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  (barras negras). Se determinó la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.\* indica una diferencia estadísticamente significativa debida a PGC-1 $\alpha$ ,  $p < 0,05$ .

### **La HRE 2 es necesaria para el efecto coactivador de PGC-1 $\alpha$ .**

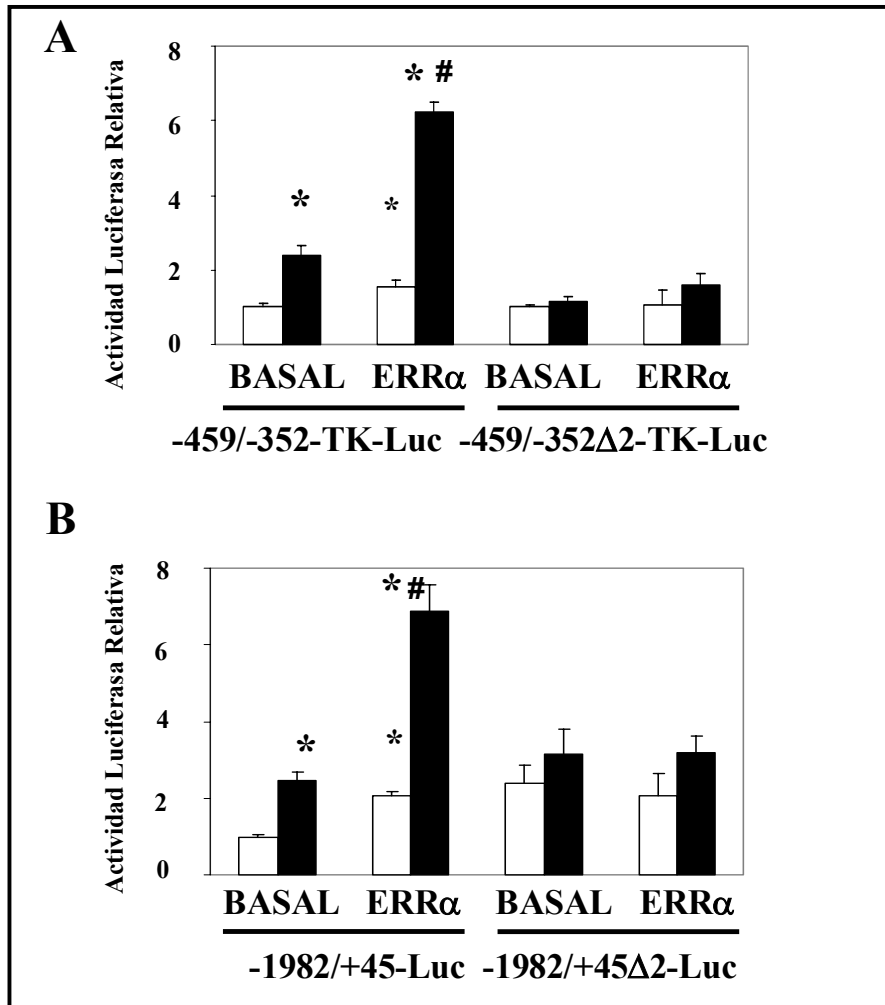
El resultado negativo con el TR condujo a un análisis más detallado del papel de cada caja en la activación por PGC-1 $\alpha$ . Se procedió a mutar cada HRE con el fin de determinar que combinación dimérica podría ser responsable de la activación por PGC-1 $\alpha$  (figura 22). La mutación de la HRE 3, tal y como esperábamos, no bloqueó el efecto de PGC-1 $\alpha$ , sorprendentemente tampoco lo hizo la mutación de la HRE 1, mientras que la mutación de la HRE 2 abolió totalmente el efecto de PGC-1 $\alpha$  (figura 22).

### **PGC-1 $\alpha$ coactiva a ERR $\alpha$ .**

Como se ha comentado, los NR se unen fundamentalmente en forma de homo- o heterodímeros, pero se ha descrito la existencia de unos pocos NR huérfanos que lo pueden hacer con gran estabilidad en forma de monómeros (Giguere, 1999). ERR $\alpha$  puede unirse tanto en forma de homodímero como de monómero en un HRE caracterizado por ser flanqueado a 5' por una zona rica en A o T (Giguere, 1999). Se ha descrito que ERR $\alpha$  a) se induce por PGC-1 $\alpha$  (Schreiber et al., 2003; Mootha et al., 2004), b) se expresa en respuesta al frío (Schreiber et al., 2003) y otras condiciones donde aumenta la expresión de PGC-1 $\alpha$  (Ichida et al., 2002), c) presenta expresión ubicua, y abundantemente en los mismos tejidos en los que lo hace PGC-1 $\alpha$  (Puigserver y Spiegelman, 2003; Schreiber et al., 2003) y d) jugar un papel en la inducción de genes involucrados en el metabolismo energético (Sladek et al., 1997; Vega y Kelly, 1997). Todos estos datos nos hicieron proponer a ERR $\alpha$  como candidato en la acción de PGC-1 $\alpha$ . La construcción -459/-352-TK-Luc fue cotransfectada con vectores de expresión para ERR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  o ambos (Fig. 23 A). Los resultados mostraron una ligera activación por ERR $\alpha$  sobre el promotor de *Mfn2* en ausencia de PGC-1 $\alpha$  y una fuerte activación sinérgica en presencia de PGC-1 $\alpha$ . La mutación de la caja HRE 2 en la construcción -459/-352-TK-Luc no mostró activación por ni por ERR $\alpha$ , ni por PGC-1 $\alpha$  ni por ERR $\alpha$  y PGC-1 $\alpha$  (Fig. 23 A). Estos resultados se verificaron en el contexto de las primeras 2 kb del promotor humano de *Mfn2*. Así, la

## Resultados

sobreexpresión conjunta de PGC-1 $\alpha$  y ERR $\alpha$  produjo una activación sinérgica del promotor de *Mfn2* (-1982/+45-Luc) respecto a la activación producida por ERR $\alpha$  o PGC-1 $\alpha$  (Fig. 23 B). La mutación del HRE 2 produjo un ligero aumento en la actividad basal del promotor sin que esta actividad se modificase por la cotransfección con PGC-1 $\alpha$  o ERR $\alpha$  y PGC-1 $\alpha$  (Fig. 23 B).

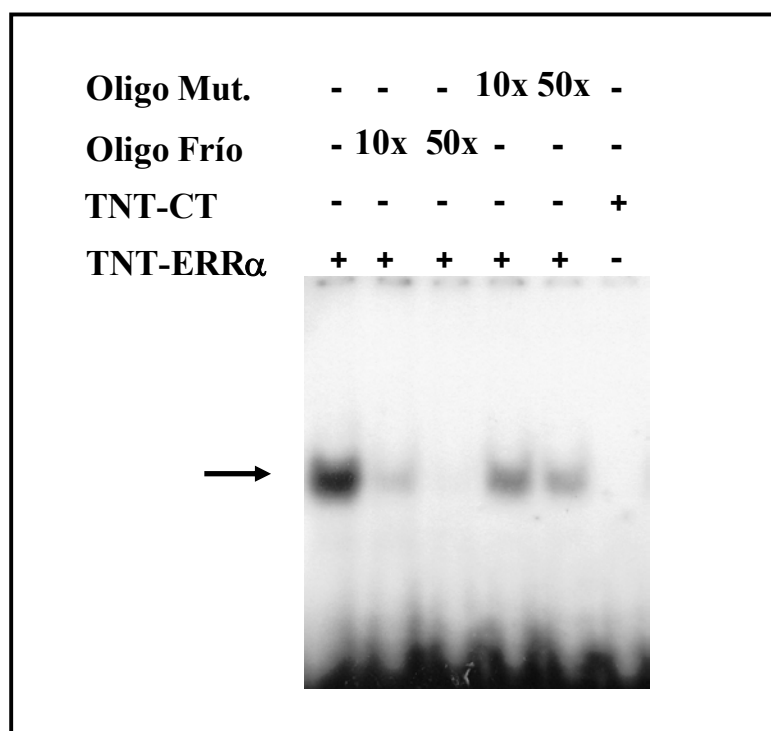


**Figura 23. PGC-1 $\alpha$  coactiva a ERR $\alpha$ .** La construcción -459/-352-TK-Luc salvaje o aquella en la que está mutada el HRE 2 (panel A) o la construcción -1982/+45-Luc salvaje o aquella con el HRE 2 mutado (panel B) se cotransfectó en células 10T1/2 con un vector de expresión irrelevante (barras blancas), un vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  (barras negras) y un vector de expresión de ERR $\alpha$  combinados. Se determinó la actividad luciferasa. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 3 experimentos realizados por triplicado. \* indica una diferencia estadísticamente significativa debida a PGC-1 $\alpha$ . # indica una diferencia estadísticamente significativa de de las cotransfecciones con PGC-1 $\alpha$  y ERR $\alpha$  respecto a la suma de los valores de la cotransfección de PGC-1 $\alpha$  y ERR $\alpha$  en solitario.  $p < 0,05$ .



**ERR $\alpha$  se une al HRE 2.**

A continuación se realizaron ensayos de *band-shift* con el objetivo de verificar la unión de ERR $\alpha$  a HRE 2. Para ello se incubó un oligonucleótido sintético con la secuencia entre -421 y -397 del promotor humano de *Mfn2* marcado radiactivamente con 3 $\mu$ l del producto de transcripción y traducción *in vitro* (TNT) del vector de expresión de ERR $\alpha$  y se observó la aparición de una banda de retardo electroforético (Fig. 24). Dicha banda era competida cuando además del oligonucleótido marcado se incubaba con un exceso de 10 y 50 veces de oligonucleótido frío. Si el competidor frío portaba la mutación en la caja la banda de retardo continuaba siendo visible incluso con un exceso de oligonucleótido mutado frío de 50 veces, aunque con una intensidad inferior que en ausencia de competidor.



**Figura 24. ERR $\alpha$  se une al HRE 2.** Se incubaron 3  $\mu$ l del producto de transcripción y traducción *in vitro* (TNT) del vector de expresión de ERR $\alpha$  con el oligonucleótido de doble cadena marcado radiactivamente correspondiente al fragmento del promotor humano de *Mfn2* comprendido entre -421/-397 . Aparece una banda de retardo (flecha) que se compete con oligonucleótido frío en exceso. La incubación con el producto de TNT de un vector inespecífico no produjo banda de retardo.

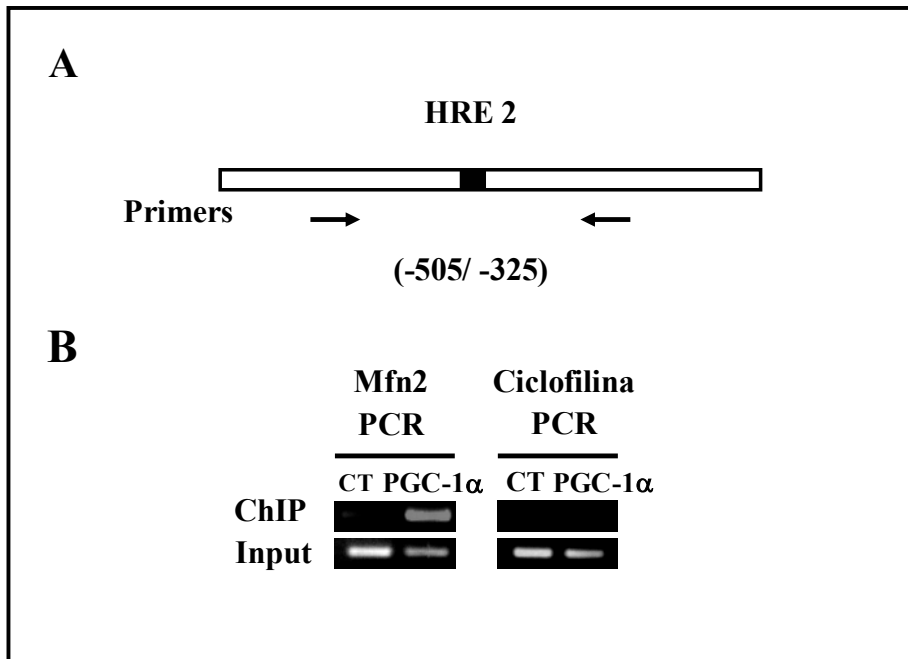
## Resultados

### **PGC-1 $\alpha$ interacciona *in vivo* con el promotor de *Mfn2*.**

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban la importancia de la caja 2 en la activación transcripcional por PGC-1 $\alpha$  del promotor de *Mfn2*. A ésta caja se une ERR $\alpha$  cuyo promotor está regulado por PGC-1 $\alpha$  (Mootha et al., 2004). El efecto sinérgico de ERR $\alpha$  y PGC-1 $\alpha$  observado en los ensayos de luciferasa descartaban que el efecto de PGC-1 $\alpha$  fuese debido a un aumento de los niveles de ERR $\alpha$ , pero no podía excluirse un posible efecto indirecto de PGC-1 $\alpha$  incrementando los niveles de un determinado factor de transcripción, el cual a su vez actuase de manera sinérgica con ERR $\alpha$ . Para demostrar un efecto directo de PGC-1 $\alpha$  se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para ello se transfectaron células HeLa, las cuales expresan ERR $\alpha$  y PGC-1 $\alpha$  es capaz de inducir la actividad transcripcional del promotor de *Mfn2* (Fig. 16 B), con un vector de expresión que codificaba para PGC-1 $\alpha$  con un epítipo *flag* y se procedió al protocolo del ChIP. El DNA inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-*flag* fue amplificado con *primers* específicos del promotor humano de *Mfn2* (Fig. 25 A) mostrando un enorme enriquecimiento del producto de PCR en las HeLa transfectadas con PGC-1 $\alpha$  respecto a HeLa transfectadas con un plásmido control (Fig. 25 B). Como control de la especificidad de la técnica se utilizaron *primers* del gen de la Ciclofilina. Cuando en la PCR se usaron *primers* del gen de la Ciclofilina no se observó el enriquecimiento observado al utilizar los *primers* específicos de *Mfn2* (Fig. 25 B). Estos resultados indican que PGC-1 $\alpha$  interacciona con el promotor de *Mfn2* incrementando su actividad transcripcional.

### **El incremento de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) inducido por PGC-1 $\alpha$ requiere una expresión inalterada de *Mfn2*.**

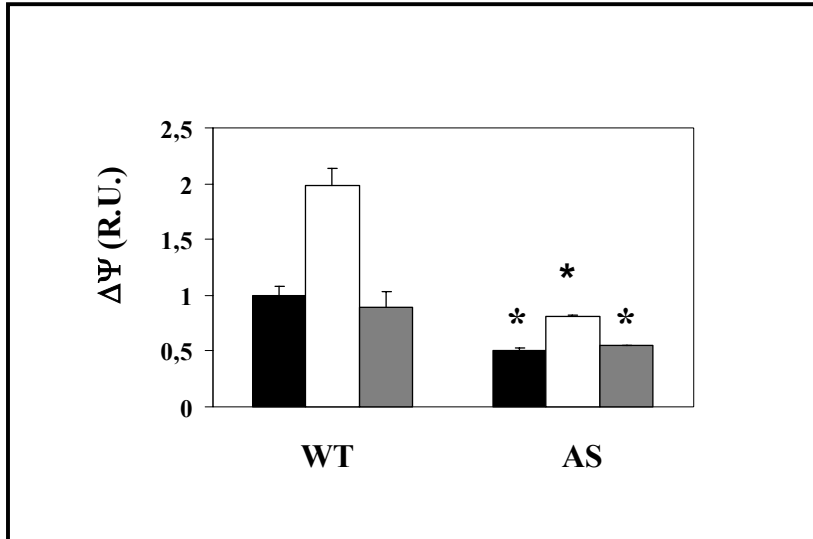
Además de actuar sobre la biogénesis mitocondrial, PGC-1 $\alpha$  aumenta el  $\Delta\Psi$  (Sano et al., 2004; St Pierre et al., 2003; Wu et al., 1999). La infección de células 10T1/2 con un adenovirus codificante para PGC-1 $\alpha$  provocó un aumento del  $\Delta\Psi$  determinado con la sonda



**Figura 25. PGC-1 $\alpha$  interacciona *in vivo* con el promotor de *Mfn2*.** A.- Representación esquemática de la situación de los *primers* que permiten amplificar el fragmento -505/-325 del gen humano de *Mfn2*. En negro se representa la caja HRE 2. B.- Se transfectaron células HeLa con un vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  con un epítipo *flag* (PGC-1 $\alpha$ ) o un vector de expresión irrelevante (CT). Las células se fijaron con formaldehído y se lisaron a continuación. El DNA sonificado fue inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-*flag*. Se rompió el *crosslinking*, y el DNA del inmunocomplejo purificado fue amplificado con *primers* específicos del gen de *Mfn2* (Mfn2 PCR) o del gen de la Ciclofilina (PCR Ciclofilina) y el producto de la PCR se visualizo por tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa. El *input* es el 10% del DNA inicial antes de inmunoprecipitarse.

DiIC<sub>1</sub>(5) (véase materiales y métodos) (Fig. 26). Células transfectadas establemente con un oligonucleótido antisentido de *Mfn2* (10T1/2-AS) mostraron que su  $\Delta\Psi$  era un 50% menor al de las 10T1/2, tal y como ya se había descrito (Bach et al., 2003), pero el incremento en el  $\Delta\Psi$  mediado por la inducción de PGC-1 $\alpha$  se vio seriamente comprometido en las células 10T1/2-AS indicando la necesidad de la inducción de *Mfn2* en la activación mitocondrial mediada por PGC-1 $\alpha$ .

## Resultados



**Figura 26. El incremento de potencial de membrana mitocondrial inducido por PGC-1 $\alpha$  requiere una expresión inalterada de Mfn2.** Células 10T1/2 (WT) o 10T1/2 transfectadas establemente con un oligonucleótido antisentido de *Mfn2* (AS) fueron infectadas con un adenovirus codificante para PGC-1 $\alpha$  (barras blancas) o  $\beta$ -Galactosidasa (barras grises) o no infectadas (barras negras). A las 48 h las células fueron incubadas con DiI<sub>1</sub>(5) y analizadas en el citómetro de flujo antes y después de añadir el desacoplador CCCP (50  $\mu$ M) para discriminar entre el potencial de membrana mitocondrial y la unión inespecífica de la sonda. Media  $\pm$  error estándar de tres experimentos realizados en triplicado. \* indica una diferencia estadísticamente significativa respecto a las 10T1/2 salvajes. p<0.05

Reference List

- al Adsani,H., Hoffer,L.J., and Silva,J.E. (1997). Resting energy expenditure is sensitive to small dose changes in patients on chronic thyroid hormone replacement. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 82, 1118-1125.
- Bach,D., Pich,S., Soriano,F.X., Vega,N., Baumgartner,B., Oriola,J., Dugaard,J.R., Lloberas,J., Camps,M., Zierath,J.R., Rabasa-Lhoret,R., Wallberg-Henriksson,H., Laville,M., Palacin,M., Vidal,H., Rivera,F., Brand,M., and Zorzano,A. (2003a). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190-17197.
- Bach,D., Pich,S., Soriano,F.X., Vega,N., Baumgartner,B., Oriola,J., Dugaard,J.R., Lloberas,J., Camps,M., Zierath,J.R., Rabasa-Lhoret,R., Wallberg-Henriksson,H., Laville,M., Palacin,M., Vidal,H., Rivera,F., Brand,M., and Zorzano,A. (2003d). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190-17197.
- Bach,D., Pich,S., Soriano,F.X., Vega,N., Baumgartner,B., Oriola,J., Dugaard,J.R., Lloberas,J., Camps,M., Zierath,J.R., Rabasa-Lhoret,R., Wallberg-Henriksson,H., Laville,M., Palacin,M., Vidal,H., Rivera,F., Brand,M., and Zorzano,A. (2003c). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190-17197.
- Bach,D., Pich,S., Soriano,F.X., Vega,N., Baumgartner,B., Oriola,J., Dugaard,J.R., Lloberas,J., Camps,M., Zierath,J.R., Rabasa-Lhoret,R., Wallberg-Henriksson,H., Laville,M., Palacin,M., Vidal,H., Rivera,F., Brand,M., and Zorzano,A. (2003b). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190-17197.
- Boss,O., Bachman,E., Vidal-Puig,A., Zhang,C.Y., Peroni,O., and Lowell,B.B. (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.
- Giguere,V. (1999c). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20, 689-725.
- Giguere,V. (1999a). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20, 689-725.
- Giguere,V. (1999b). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20, 689-725.
- Glass,C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* 15, 391-407.

## Resultados

Ichida, M., Nemoto, S., and Finkel, T. (2002). Identification of a specific molecular repressor of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma Coactivator-1 alpha (PGC-1alpha). *J. Biol. Chem.* **277**, 50991-50995.

Landsberg, L., Saville, M.E., and Young, J.B. (1984). Sympathoadrenal system and regulation of thermogenesis. *Am. J. Physiol* **247**, E181-E189.

Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (2000a). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652-660.

Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (2000c). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652-660.

Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (2000b). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652-660.

Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P., and Spiegelman, B.M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 3820-3825.

Mootha, V.K., Handschin, C., Arlow, D., Xie, X., St Pierre, J., Sihag, S., Yang, W., Altshuler, D., Puigserver, P., Patterson, N., Willy, P.J., Schulman, I.G., Heyman, R.A., Lander, E.S., and Spiegelman, B.M. (2004a). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 6570-6575.

Mootha, V.K., Handschin, C., Arlow, D., Xie, X., St Pierre, J., Sihag, S., Yang, W., Altshuler, D., Puigserver, P., Patterson, N., Willy, P.J., Schulman, I.G., Heyman, R.A., Lander, E.S., and Spiegelman, B.M. (2004b). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 6570-6575.

Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., and Spiegelman, B.M. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**, 550-555.

Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* **24**, 78-90.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998a). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998b). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998c). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.

Sano, M., Wang, S.C., Shirai, M., Scaglia, F., Xie, M., Sakai, S., Tanaka, T., Kulkarni, P.A., Barger, P.M., Youker, K.A., Taffet, G.E., Hamamori, Y., Michael, L.H., Craigen, W.J., and

Schneider,M.D. (2004). Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *EMBO J.* 23, 3559-3569.

Schreiber,S.N., Knutti,D., Brogli,K., Uhlmann,T., and Kralli,A. (2003c). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J. Biol. Chem.* 278, 9013-9018.

Schreiber,S.N., Knutti,D., Brogli,K., Uhlmann,T., and Kralli,A. (2003a). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J. Biol. Chem.* 278, 9013-9018.

Schreiber,S.N., Knutti,D., Brogli,K., Uhlmann,T., and Kralli,A. (2003b). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J. Biol. Chem.* 278, 9013-9018.

Sladek,R., Bader,J.A., and Giguere,V. (1997). The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol. Cell Biol.* 17, 5400-5409.

St Pierre,J., Lin,J., Krauss,S., Tarr,P.T., Yang,R., Newgard,C.B., and Spiegelman,B.M. (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 278, 26597-26603.

Vega,R.B. and Kelly,D.P. (1997). A role for estrogen-related receptor alpha in the control of mitochondrial fatty acid beta-oxidation during brown adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 272, 31693-31699.

Wu,Z., Puigserver,P., Andersson,U., Zhang,C., Adelmant,G., Mootha,V., Troy,A., Cinti,S., Lowell,B., Scarpulla,R.C., and Spiegelman,B.M. (1999a). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.

Wu,Z., Puigserver,P., Andersson,U., Zhang,C., Adelmant,G., Mootha,V., Troy,A., Cinti,S., Lowell,B., Scarpulla,R.C., and Spiegelman,B.M. (1999b). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.

Wu,Z., Puigserver,P., Andersson,U., Zhang,C., Adelmant,G., Mootha,V., Troy,A., Cinti,S., Lowell,B., Scarpulla,R.C., and Spiegelman,B.M. (1999c). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.

### **3. Papel de MEF2 en la regulación de *Mfn2* en fibras musculares oxidativas y glucolíticas.**

Los resultados obtenidos en el apartado anterior sugieren que *Mfn2* juega un papel determinante en la regulación de la homeostasis energética. La expresión de *Mfn2* en humanos es abundante en tejidos con elevado consumo energético (Bach et al., 2003) tales como corazón y músculo esquelético. Así, la expresión de *Mfn2* se induce fuertemente durante el proceso de diferenciación muscular (Bach et al., 2003). Basándose en la presencia de una forma específica de la cadena pesada de la miosina (MyHC) el músculo esquelético comprende dos tipos de fibra fundamentalmente. Las fibras lentas o tipo 1 y las fibras rápidas o tipo 2. Las tipo 2 pueden subdividirse en 2A, 2X y 2B. Fibras de tipo intermedio con composición mezclada de la MyHC se hallan presentes en la mayoría de los músculos esqueléticos. Cada tipo de fibra se diferencia además por sus características metabólicas. Las fibras tipo 1 y 2A son oxidativas, las 2X intermedias y las fibras tipo B glucolíticas. Quisimos respondernos a la pregunta de si fibras musculares con un metabolismo oxidativo expresan más *Mfn2* que aquellas con un metabolismo glucolítico, lo que aportaría una nueva evidencia del papel bioenergético de *Mfn2*, y como se regula esta expresión.

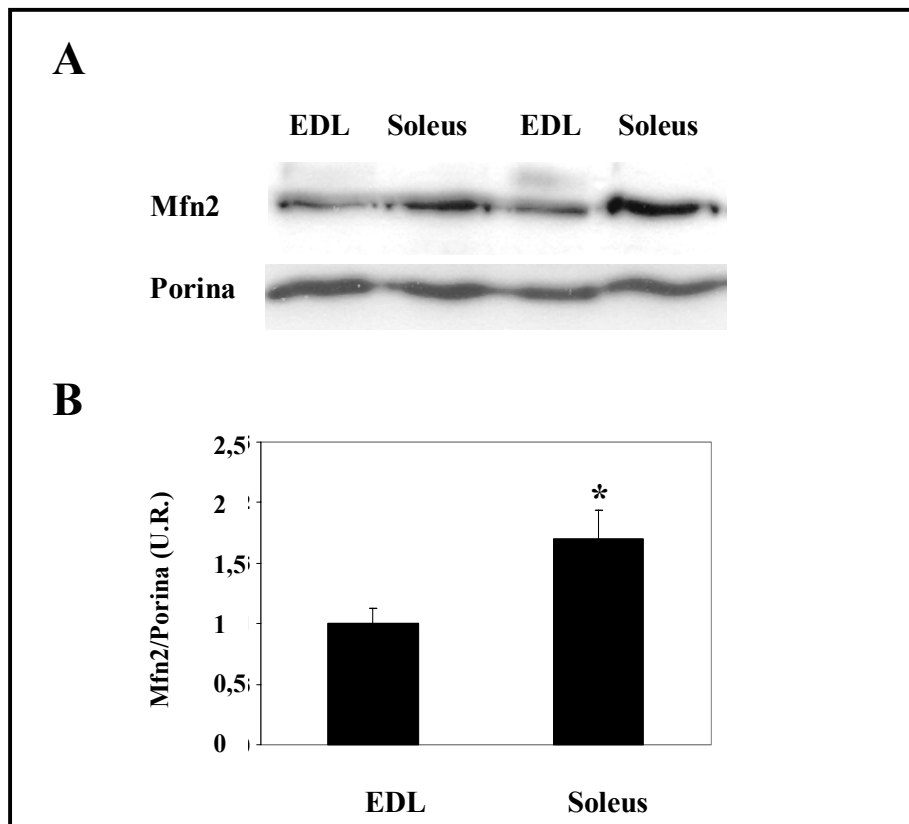
#### **La abundancia mitocondrial de *Mfn2* es superior en músculo soleus que en músculo EDL.**

A partir de ratas Wistar se obtuvieron fracciones mitocondriales de músculo soleus (rico en fibras oxidativas de tipo 1) y de EDL (enriquecido con fibras glucolíticas de tipo 2B). Se



## Resultados

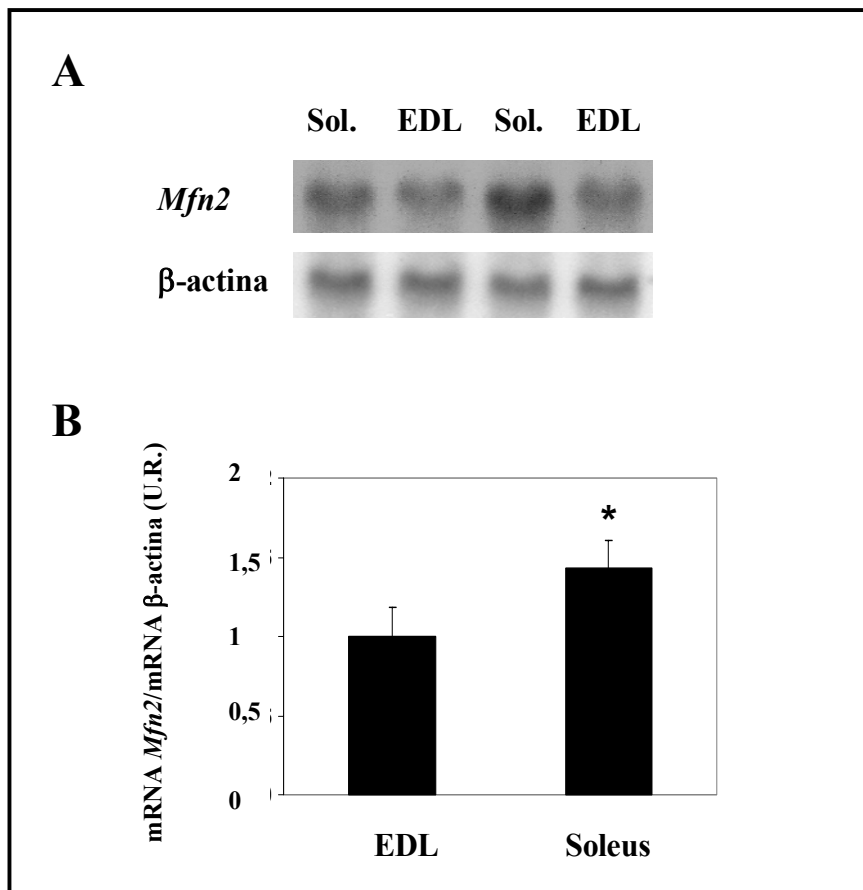
cargaron 40  $\mu\text{g}$  de la fracción mitocondrial de cada uno de ellas para ser analizados por *Western blot*. Como control de carga se utilizó el anticuerpo contra la proteína mitocondrial porina. El uso de un anticuerpo específico contra Mfn2 y el posterior análisis densitométrico reveló que en soleus, músculo de contracción lenta y metabolismo oxidativo, se expresaba un 75 % más Mfn2 por unidad de masa mitocondrial que en EDL (Fig. 27).



**Figura 27. Abundancia de Mfn2 en las fracciones mitocondriales de músculo soleus y EDL.** Se obtuvieron las fracciones mitocondriales del músculo soleus y EDL de 4 ratas Wistar. A.- Se realizaron ensayos de *Western blot* para detectar Mfn2 a partir de 40  $\mu\text{g}$  de proteína mitocondrial. La misma membrana se reveló con un anticuerpo contra porina, como control de carga. B.- Representación gráfica de la media  $\pm$  error estándar de los valores del análisis densitométrico de los niveles de Mfn2 corregidos por los niveles de porina. \* indica una diferencia estadísticamente significativa de los valores de Mfn2 en soleus comparado con EDL.  $p=0,0092$

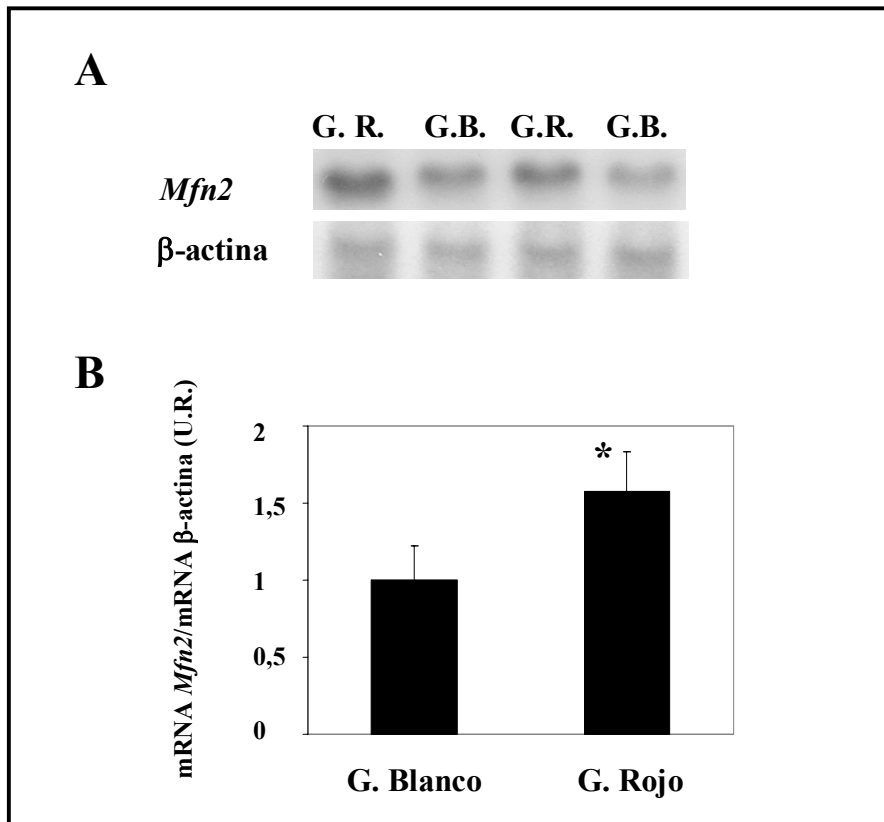
**Hay mayor expresión de mRNA de *Mfn2* en músculo soleus que en EDL.**

Cada tipo de fibra muscular tiene un programa distinto de expresión génica. Se comprobó si la diferencia de expresión de la proteína Mfn2 entre Soleus y EDL se debía a diferencias en la expresión del gen. Se analizó RNA extraído a partir de músculo soleus y EDL de ratas Wistar por *Northern blot*. La expresión de *Mfn2* en músculo soleus fue significativamente mayor (un 50%) que en músculo EDL (Fig. 28). Como control de carga las mismas membranas fueron hibridadas con una sonda contra la  $\beta$ -actina.



**Figura 28. Expresión de mRNA de *Mfn2* en músculos soleus y EDL.** Se purificó RNA de músculo soleus y EDL de 4 ratas wistar. A.- Se realizaron ensayos de *Northern blot*. El mRNA de *Mfn2* se detectó mediante una sonda de 1 kb del cDNA de *Mfn2*. Como control de carga se utilizó una sonda contra  $\beta$ -actina. B.- Representación gráfica de la media  $\pm$  error estándar de los valores del análisis densitométrico del mRNA de *Mfn2* corregido con el de  $\beta$ -actina. \* indica una diferencia estadísticamente significativa del mRNA de *Mfn2* en soleus respecto a EDL.  $p= 0,0052$ .

## Resultados



**Figura 29. Expresión de mRNA de *Mfn2* en las fracciones roja y blanca de músculo gastrocnemius.** Se separaron las fracciones rojas (G.R.) y blancas (G.R.) del músculo gastrocnemius de 4 ratas Wistar. Se purificó el RNA de las distintas fracciones y se analizaron por *Northern blot*. A.- El mRNA de *Mfn2* se detectó mediante una sonda de 1 kb del cDNA de *Mfn2*. Como control de carga se utilizó una sonda contra  $\beta$ -actina. B.- Representación gráfica de la media  $\pm$  error estándar de los valores del análisis densitométrico del mRNA de *Mfn2* corregido con el de  $\beta$ -actina. \* indica una diferencia estadísticamente significativa del mRNA de *Mfn2* en el gastrocnemius rojo respecto al gastrocnemius blanco.  $p=0,0032$ .

### **Gastrocnemius rojo expresa más *Mfn2* que gastrocnemius blanco.**

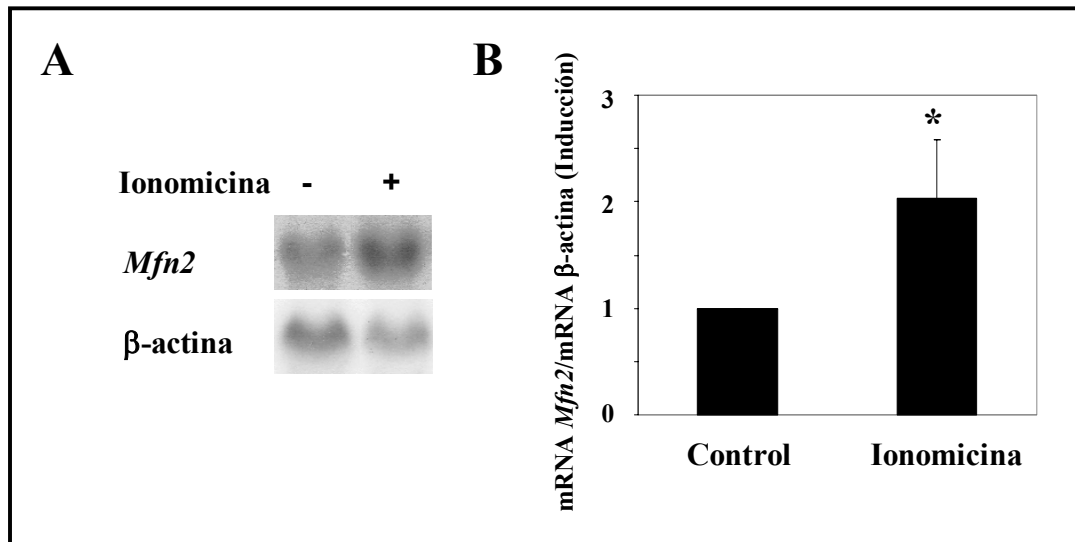
Los dos resultados anteriores comparan los niveles de *Mfn2* en 2 músculos con función y características tanto contractiles como metabólicas muy distintas. El músculo gastrocnemius contiene una mezcla de fibras oxidativas y glucolíticas. La fracción oxidativa se puede separar fácilmente debido a su coloración roja oscura de las fibras glucolíticas que son de un color rojo pálido. Se separó de ratas wistar la fracción oxidativa y la glucolitica del músculo gastrocnemius para determinar si las diferencias de expresión de *Mfn2* observadas

entre soleus y EDL también se producían cuando se comparaba partes de un mismo músculo con diferentes actividades metabólicas. Las distintas fracciones de Gastrocnemius fueron procesadas para aislar RNA y analizadas por *Northern blot*. La fracción oxidativa expresaba un 50% más de mRNA de *Mfn2* que la fracción glucolítica (Fig 29). Como control de carga las mismas membranas fueron hibridadas contra  $\beta$ -actina.

**La expresión de *Mfn2* se regula por incrementos en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular.**

La concentración y amplitud de la entrada de  $Ca^{2+}$  intracelular como consecuencia de la actividad neuromuscular es responsable de la activación de cascadas de señalización que regulan la expresión de genes característicos de los diversos tipos de fibra muscular (Schiaffino y Serrano, 2002). Los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular son mayores en fibras lentas que en fibras rápidas y aumentan en fibras rápidas estimuladas crónicamente con frecuencias bajas (Carroll et al., 1999). El incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  activa enzimas regulados por  $Ca^{2+}$  como la proteína fosfatasa calcineurina y la proteína quinasa CaMK que están relacionados con el control del tipo de fibra muscular (McKinsey et al., 2002; Schiaffino y Serrano, 2002). Con el objetivo de asociar elevaciones en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular con la expresión de *Mfn2*, se trataron miotubos L6E9 con Ionomicina  $1\mu M$  durante 24 horas o DMSO, que es el vehículo en el que se disuelve la Ionomicina. La ionomicina es un ionoforo de  $Ca^{2+}$  que se ha descrito es capaz de activar en células musculares a la calcineurina (Wu et al., 2000) y la CaMK (Li et al., 2002). A partir del RNA purificado de las células tratadas con Ionomicina o las tratadas con DMSO se realizaron ensayos de *Northern blot* y se determinó la expresión de *Mfn2*. El tratamiento con ionomicina indujo 2 veces la expresión de *Mfn2* en células L6E9 miotubos comparadas con el control (Fig 30). De estos resultados se concluye que el aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico regula la expresión de *Mfn2*. Además, podemos sugerir un posible papel de calcineurina y/o CaMK en la vía de señalización que regula la expresión de *Mfn2*.

## Resultados

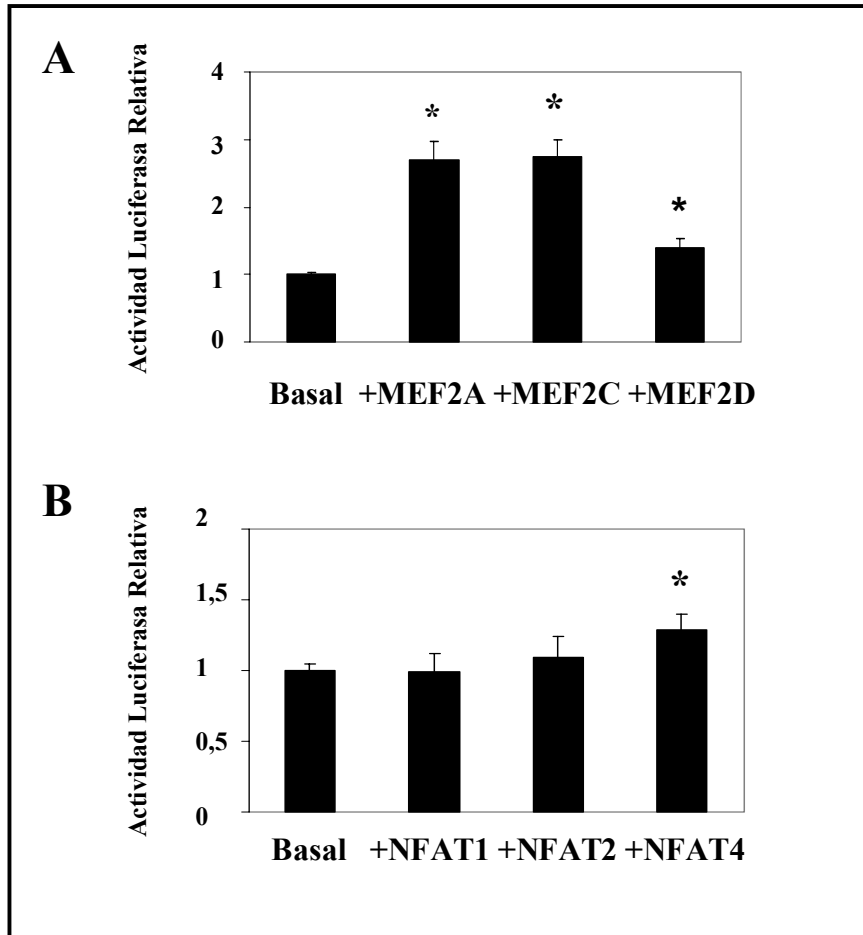


**Figura 30. La expresión de *Mfn2* se regula por cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .** A.- Células L6E9 miotubos fueron tratadas con ionomicina 1  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. Se extrajo el RNA y las muestras se analizaron por *Northern blot*. El mRNA de *Mfn2* se detectó mediante una sonda de 1 kb del cDNA de *Mfn2*. Como control de carga se utilizó una sonda contra  $\beta$ -actina. B.- Representación gráfica de la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes de los valores del análisis densitométrico del mRNA de *Mfn2* corregidos con los valores de  $\beta$ -actina. \* indica una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de mRNA de *Mfn2* en L6E9 tratadas con ionomicina respecto a las tratadas con el vehículo.  $P=0,033$ .

### MEF2 activa la expresión de *Mfn2*.

Los efectores *downstream* de calcineurina son NFAT y MEF2, y estas proteínas se han implicado en la activación de la expresión de genes en fibras de tipo I (Olson y Williams, 2000a; Schiaffino y Serrano, 2002). Uno de los principales efectores de CaMK es MEF2 (McKinsey et al., 2002). Para comprobar si alguno de estos factores podía regular la expresión de *Mfn2* en la fibra oxidativa, células 10T1/2 fueron cotransfectadas con la construcción -1982/+45 del gen humano de *Mfn2* dirigiendo la expresión del gen reportero Luciferasa (-1982/+45-Luc) con un vector de expresión irrelevante o con diversos vectores de expresión de la familia MEF2. Se midió la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Los tres miembros de la familia MEF2 incrementaron de forma significativa la actividad transcripcional del promotor de *Mfn2* aunque MEF2D lo

hizo modestamente. Las inducciones mediadas por MEF2A y MEF2C fueron similares, de tres veces respecto al basal (Fig. 31 A).

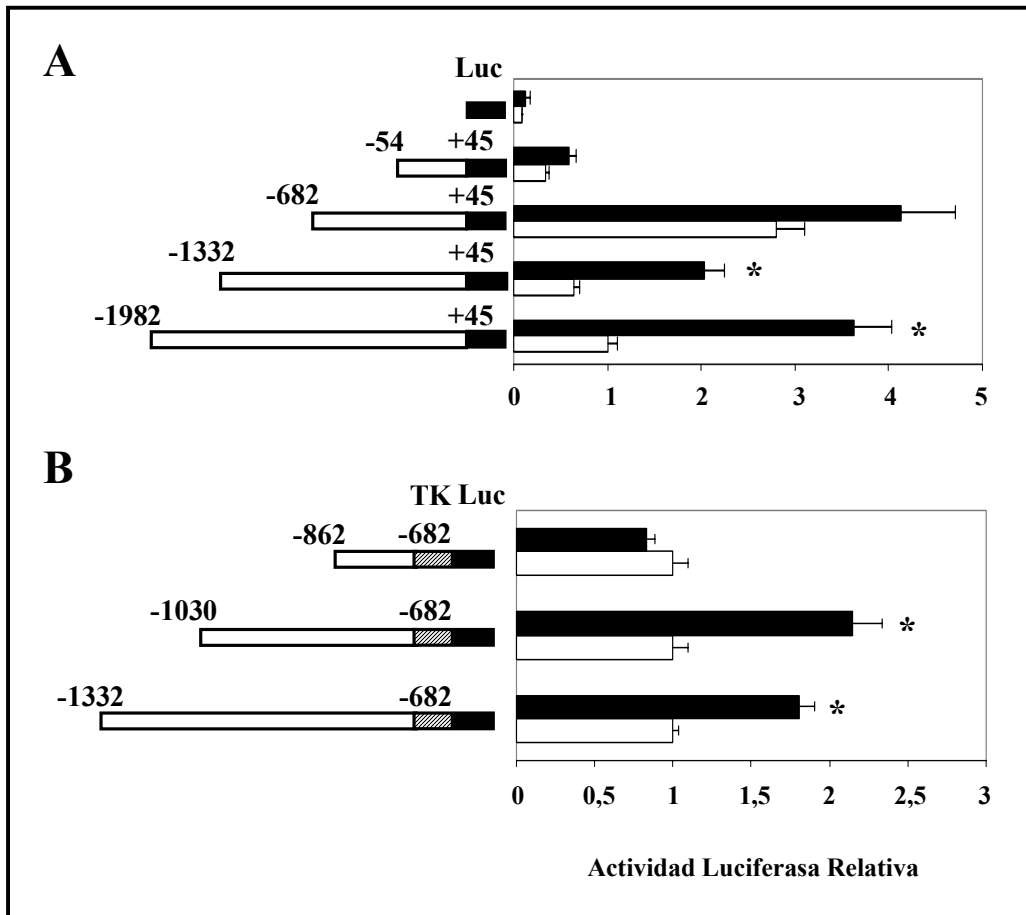


**Figura 31. MEF2 activa la expresión de *Mfn2*.** Células 10T1/2 se cotransfectaron con la construcción -1982/+45-Luc y un vector de expresión irrelevante (basal) o vectores de expresión de MEF2A, MEF2C o MEF2D (panel A) o NFAT1, NFAT2 o NFAT4 (panel B). A las 40 horas se determinó la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos realizados por triplicado. \* Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al basal.  $P < 0,05$ .

Para determinar el papel de los miembros de la familia NFAT, células 10T1/2 se cotransfectaron con -1982/+45-Luc junto con un vector de expresión irrelevante o con un vector de expresión de NFAT1 (NFATp), NFAT2 (NFATc) o NFAT4 (NFATc3). De los tres miembros de la familia NFAT sólo NFAT4 mostró un ligero aumento en la actividad transcripcional del promotor de *Mfn2* (Fig. 31 B). La falta de efecto de los otros dos

## Resultados

miembros de la familia NFAT sobre el promotor de *Mfn2* en este tipo de ensayos no descarta que estos factores puedan estar regulando *in vivo* la expresión de *Mfn2*.



**Figura 32. MEF2 actúa en el promotor de *Mfn2* entre las bases -1030 y -862.** Células 10T1/2 fueron cotransfectadas con (panel A) la construcción -1982/+45-Luc o sus deleciones a 5' como se indica o (panel B) el fragmento del promotor de *Mfn2* comprendido entre -1332 y -682 colocado a modo de *enhancer* en la construcción TK-Luc o sus deleciones a 5' junto con un vector de expresión irrelevante (barras blancas) o un vector de expresión de MEF2A (barras negras). A las 40 horas se determinó la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres a cinco experimentos realizados por triplicado. \* Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto a la transfección con el plásmido irrelevante.  $P < 0,05$ .

### MEF2 actúa en el promotor de *Mfn2* entre las bases -1030 y -862.

Para estudiar con mayor detalle la regulación de *Mfn2* por MEF2 se procedió a mapear la zona donde actúa MEF2. En primer lugar se realizaron cotransfecciones del vector de

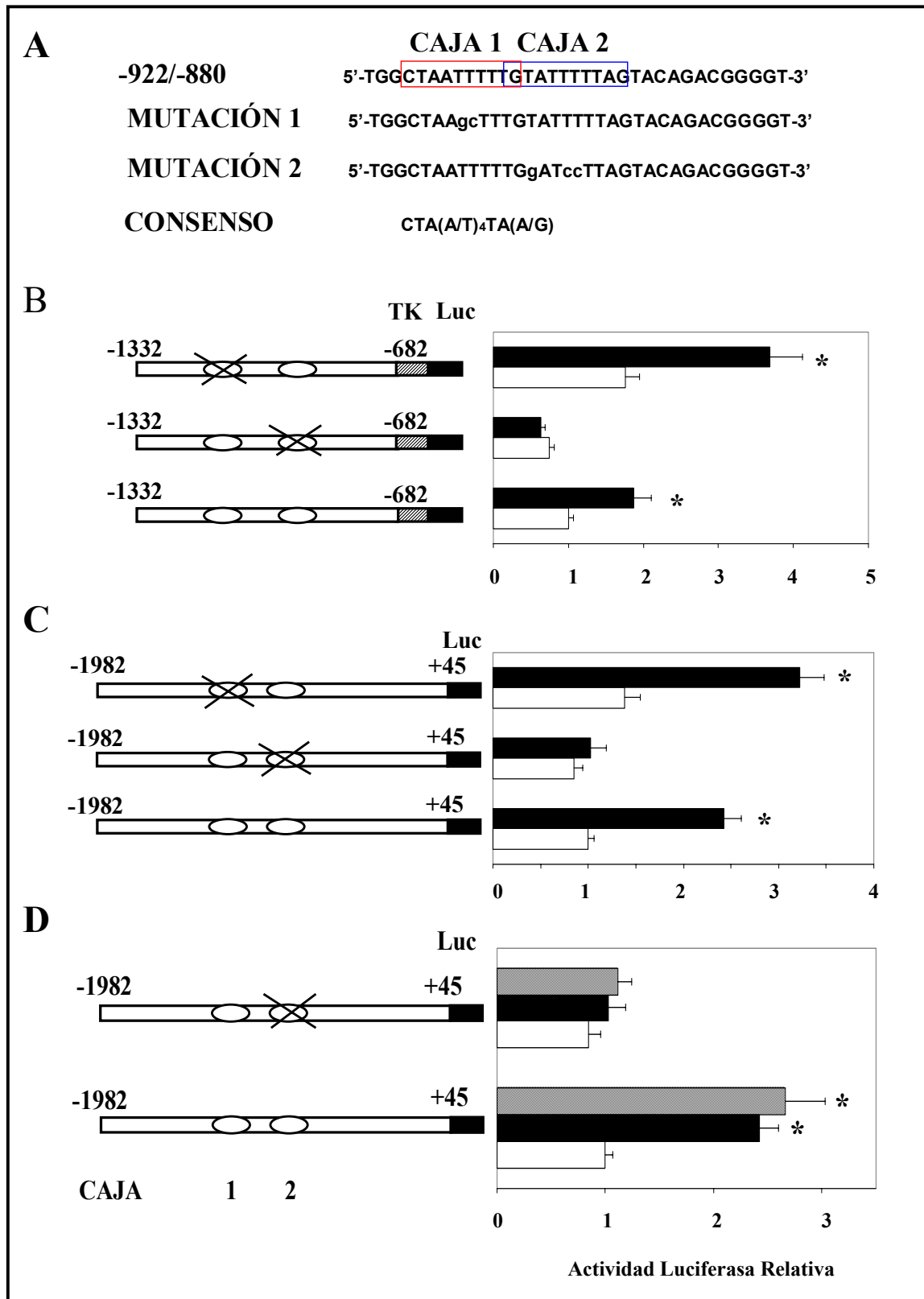
expresión de MEF2A con deleciones a 5' de la construcción -1982/+45-Luc. Los resultados obtenidos mediante ensayo luciferasa mostraron que entre las bases -1332 y -682 se hallaba el lugar de unión de MEF2A al promotor de *Mfn2* (Fig. 32 A). Una vez localizada esta región como lugar de unión de MEF2A se realizaron nuevas construcciones colocando esta región a modo de *enhancer* a 5' del promotor de la TK que dirigía al gen reportero de la luciferasa. En este contexto la región del promotor de *Mfn2* clonada continuaba respondiendo a MEF2A (Fig. 32 B). Dos nuevas deleciones a 5' de esta construcción permitieron determinar que con la eliminación del fragmento -1030/-862 se perdía el efecto activador de MEF2A (Fig. 32 B).

**De las dos posibles cajas de unión a MEF2 existentes entre -1030 y -862 sólo la caja 2 responde a MEF2.**

Los factores de transcripción de la familia MEF2 se unen a secuencias ricas en A y T. La observación minuciosa del fragmento -1030/-862 donde actúa MEF2A reveló la existencia de 2 posibles cajas de unión de MEF2 parcialmente solapadas (Fig. 33 A). Para determinar el papel funcional de cada una de ellas en respuesta a MEF2 se mutaron como se indica en la figura 34 A. Este tipo de mutaciones en la región rica en A/T ha sido utilizada con éxito por otros (Czubryt et al., 2003; Santalucia et al., 2001). La cotransfección en células 10T1/2 con un vector de expresión de MEF2A junto con el fragmento del promotor de *Mfn2* -1332/-682 mutado en la caja 1 no perdió la capacidad activadora de MEF2A observada en la secuencia salvaje (Fig. 33 B) Al mutarse la caja 2 el efecto activador de MEF2A se bloqueó totalmente (Fig. 33 B). A continuación se realizaron las mismas mutaciones en el contexto de las 2 kb del promotor humano de *Mfn2*. El resultado obtenido fue el mismo que cuando se utilizó la secuencia -1332/-682, la mutación en la caja 1 no modificaba el efecto activador de MEF2A y la mutación en la caja 2 lo suprimía totalmente (Fig. 33 C).

Por último se comprobó que la mutación de la caja 2 provocó la inhibición del efecto estimulador de MEF2C (Fig. 33 D).

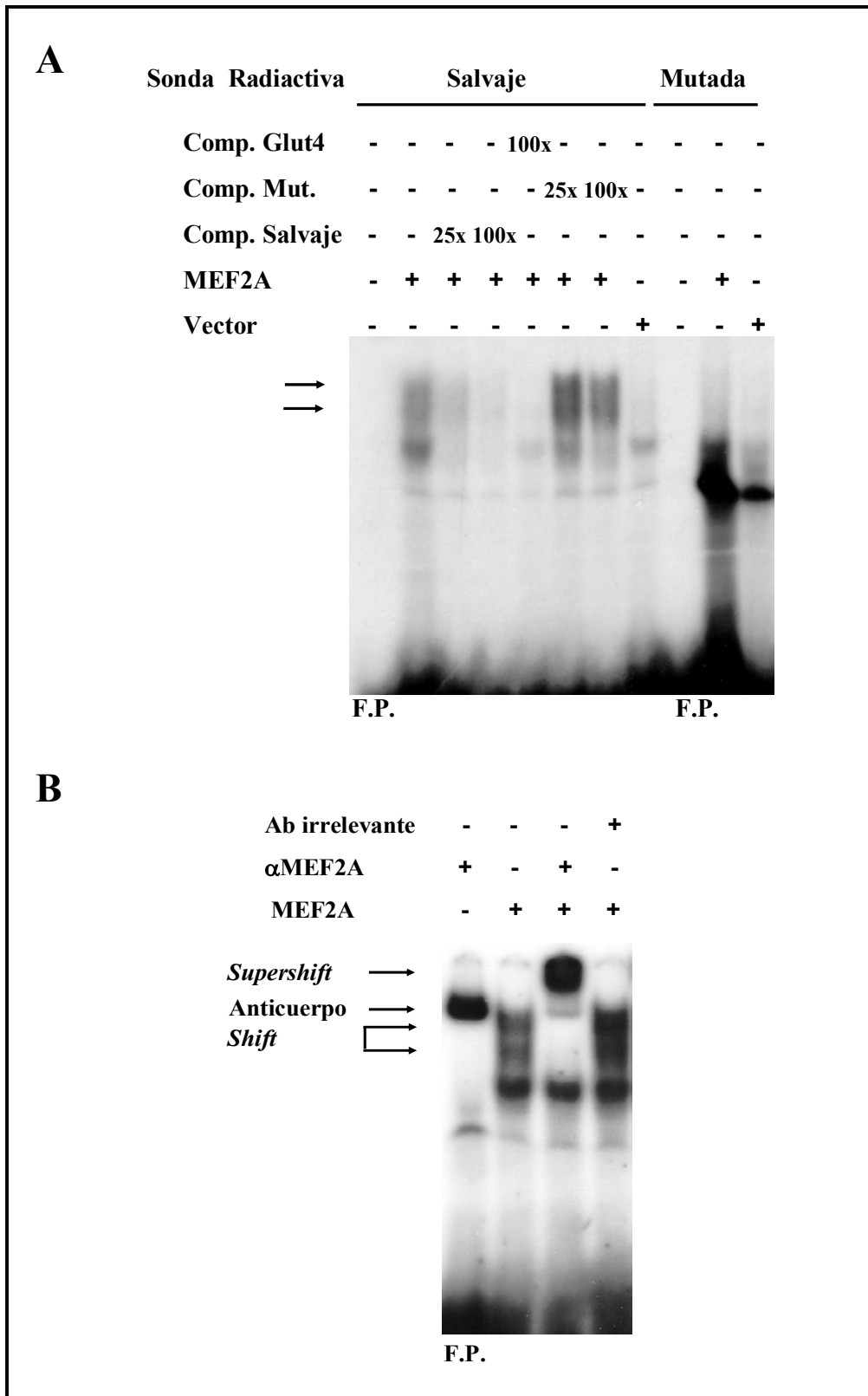




**Figura 33. Entre -1030 y -862 existen dos posibles cajas de unión a MEF2, pero solo la caja 2 responde a MEF2.** A.- Secuencia de las dos posibles cajas de unión a MEF2 existentes entre -1030 y -862 y de las mutaciones que se generaron. Células 10T1/2 fueron transfectadas con la construcción -1332/-682-TK-Luc (panel B), -1982/+45-Luc (panel C) salvajes o con mutaciones en las cajas MEF2 como se indica junto a un vector de expresión irrelevante (barras blancas) o un vector de expresión de MEF2A (barras negras). (Panel D) Células 10T1/2 fueron transfectadas con la construcción -1982/+45-Luc salvaje o con una mutación en la caja 2 junto con un vector de expresión irrelevante (barras blancas) o un vector de expresión de MEF2A (barras negras) o un vector de expresión de MEF2C (barras ralladas). A las 40 horas se determinó la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos realizados por triplicado. \* Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto a la transfección con el plásmido irrelevante.  $P < 0,05$ .

### **MEF2A se une a la caja 2 *in vitro*.**

Los ensayos funcionales mostrados en el apartado anterior indicaban una unión de MEF2 a la caja 2. Para demostrar la unión de MEF2A a la caja 2 se procedió a la realización de ensayos de *band-shift*. Células HeLa, que no expresan MEF2, fueron transfectadas con el vector de expresión para MEF2A. Al cabo de 48 horas se procedió a purificar extractos nucleares (véase materiales y métodos). La incubación de 4  $\mu$ g de extractos nucleares con un oligonucleótido radiactivo que contenía la secuencia de la caja 2, mostró dos bandas de retardo, características de MEF2 (Czubryt et al., 2003; Santalucia et al., 2001), al correrse en un gel de acrilamida (Fig. 34 A). Con la sonda libre no incubada con extractos nucleares o incubada con extractos nucleares de HeLa transfectadas con un plásmido irrelevante no se detectaron las bandas de retardo (Fig. 34 A; carriles 1 y 8). Las bandas de retardo se compitieron cuando la incubación se produjo con un exceso de oligonucleótido no radiactivo (Fig. 34 A; carriles 3 y 4) o cuando la incubación se produjo con un exceso de oligonucleótido correspondiente al *enhancer* específico de músculo de Glut4 donde se ha demostrado la función de MEF2 (Santalucia et al., 2001) (Fig. 34 A; carril 5). La incubación con un oligonucleótido no radiactivo con la caja 2 mutada no produjo cambios de la unión de MEF2A al oligonucleótido salvaje marcado (Fig. 34 A; carriles 6 y 7). En concordancia con la incapacidad de competir el oligonucleótido mutado frío, incluso con un exceso de 100 veces, cuando se marcó radiactivamente el oligonucleótido mutado y se incubó con extractos nucleares de células HeLa transfectadas con el vector de expresión de MEF2A no se detectaron las bandas de retardo observadas con el oligonucleótido salvaje (Fig. 34 A; carril 10).



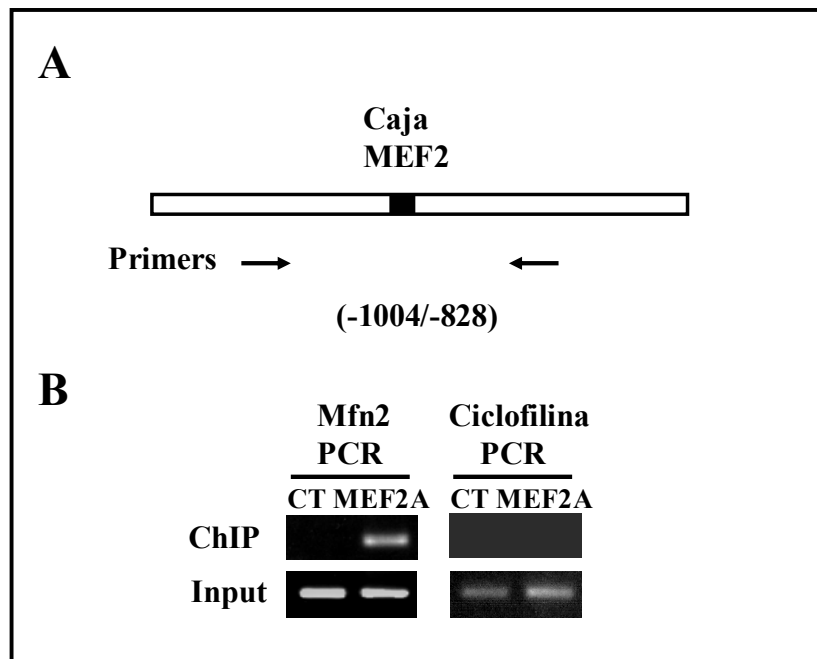
**Figura 34. MEF2A se une a la caja 2.** Células HeLa fueron transfectadas con un vector de expresión de MEF2A o irrelevante, se purificaron extractos nucleares. A.- 4 µg de extractos nucleares se utilizaron en ensayos de *band-shift*. Las flechas indican las bandas de retardo de MEF2A que son competidas por el oligonucleótido frío (comp. salvaje) o un oligonucleótido del promotor de Glut4 que une MEF2 (comp. Glut4), pero no por el oligonucleótido frío mutado (comp. Mut.). La incubación con el oligonucleótido mutado marcado no produjo las bandas de retardo. B.- Se confirmó que la banda de retardo observada se debía a la unión de MEF2 con el oligonucleótido radiactivo al incubarse con un anticuerpo específico contra MEF2A y visualizarse un *supershift*. La incubación con un anticuerpo irrelevante no produjo un cambio de movilidad de la banda de retardo.

En ensayos de *band-shift* la prueba de que la banda de retardo observada corresponde al factor en cuestión se consigue incubando la mezcla oligonucleótido marcado-extractos nucleares con un anticuerpo específico del factor de transcripción de interés. En tales circunstancias o bien la banda de retardo tiene una menor migración produciendo lo que se denomina un *supershift* o bien se evita la unión del factor de transcripción al oligonucleótido marcado. El ensayo de *band-shift* con la presencia de un anticuerpo policlonal contra MEF2A (Mora y Pessin, 2000) produjo un *supershift* de la banda de retardo (Fig. 34 B). Cuando la incubación se realizó junto con anticuerpo policlonal irrelevante producido en conejo, al igual que el de MEF2A, no se produjo un *supershift* ni se alteró la banda de retardo (Fig. 34 B).

#### **MEF2 se une *in vivo* al promotor de *Mfn2*.**

Para demostrar que la unión de MEF2A al promotor de *Mfn2* se produce también en el contexto de la complejidad cromosómica se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Los *primers* específicos del promotor de *Mfn2* (Fig. 36 A) amplificaron el DNA inmunoprecipitado por un anticuerpo contra MEF2A de lisados de las células de origen humano HeLa transfectadas con el vector de expresión de MEF2A. Esto no sucedió cuando la transfección se produjo con un plásmido irrelevante. La especificidad de la técnica se demostró al no producirse amplificación ni en células control ni en células transfectadas con el vector para MEF2A cuando los *primers* utilizados eran específicos del gen de la ciclofilina (Fig. 35 B).

## Resultados



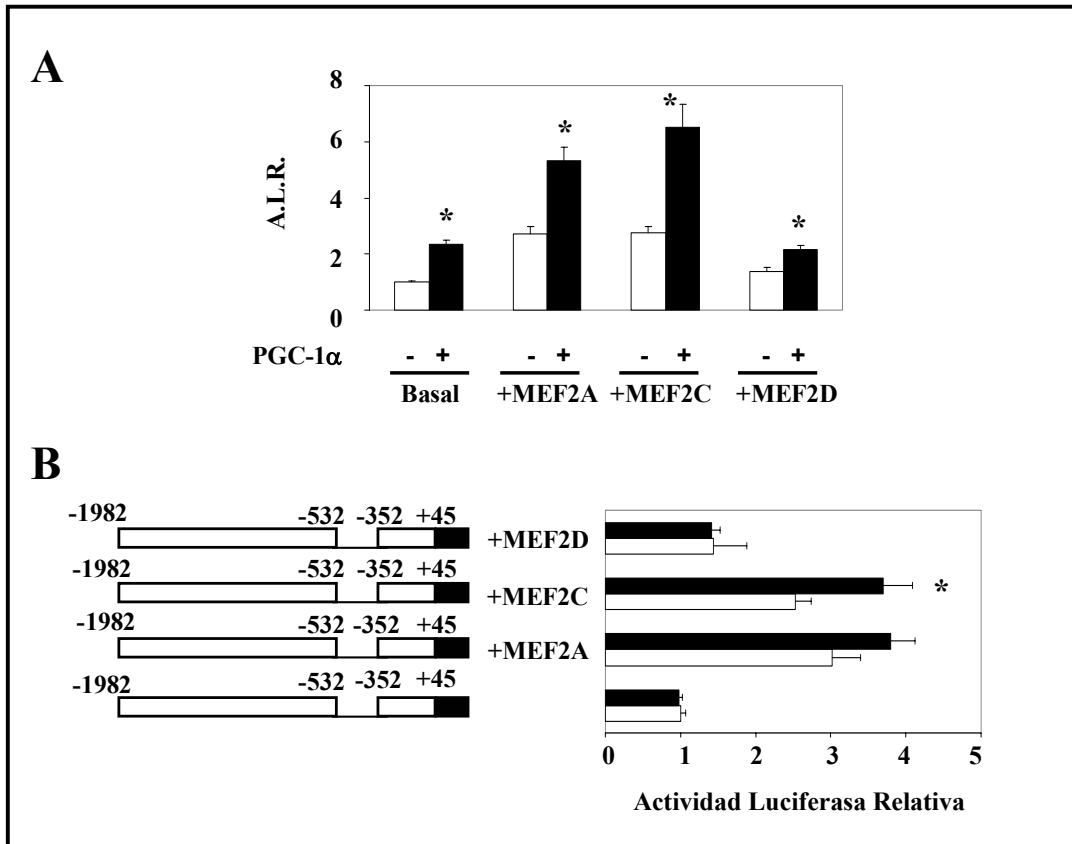
**Figura 35. MEF2A se une *in vivo* al promotor de *Mfn2*.** A.- Representación esquemática de la posición de los *primers* que permiten amplificar el fragmento -1004/-828 del promotor humano de *Mfn2*. B.- Células HeLa se transfectaron con un vector de expresión de MEF2A (MEF2A) o un vector de expresión irrelevante (CT). A las 72 horas las células se fijaron, lisaron y sonicaron. Se inmunoprecipitaron con un anticuerpo contra MEF2A. Se purificó el DNA inmunoprecipitado y se realizó una PCR con *primers* específicos del promotor de *Mfn2* (Mfn2 PCR) o con *primers* que amplifican el gen de la ciclofilina (ciclofilina PCR) el producto de PCR visualizado por tinción de bromuro de etidio en un gel de agarosa sólo se detectó con los *primers* específicos del promotor de *Mfn2* en las HeLa que sobreexpresan MEF2A. El input representa un 10% del DNA inicial antes de incubarse con el anticuerpo contra MEF2A.

### PGC-1 $\alpha$ no coactiva a MEF2 en el promotor de *Mfn2*.

PGC-1 $\alpha$  influye en el fenotipo de las fibras musculares de tipo I coactivando a MEF2D en el gen de la MyHC (Lin et al., 2002). La coactivación de MEF2A por PGC-1 $\alpha$  se ha descrito en el gen de Glut4 (Michael et al., 2001) y en el propio gen de PGC-1 $\alpha$  en un proceso de realimentación positivo (Czubryt et al., 2003). La capacidad de PGC-1 $\alpha$  de coactivar a un determinado factor es específico de promotor (Puigserver et al., 1998). En la sección anterior se demostró como PGC-1 $\alpha$  inducía la actividad transcripcional del promotor de *Mfn2* mediante ERR $\alpha$ . Para comprobar si MEF2 podría ser coactivado por PGC-1 $\alpha$  en el promotor de *Mfn2* se cotransfectó en células 10T1/2 la construcción -

1984/+45-Luc junto con los diferentes vectores de expresión de MEF2 en presencia o ausencia del vector de expresión de PGC-1 $\alpha$ . Los resultados de actividad luciferasa como medida de la actividad transcripcional se muestran en la figura 36 A. Se observó una mayor actividad transcripcional de MEF2A y MEF2C cuando son transfectados junto con PGC-1 $\alpha$ , pero el incremento en la actividad transcripcional puede asumirse a un efecto aditivo de la actividad inducida por MEF2 más la de PGC-1 $\alpha$  al actuar sobre el ERR $\alpha$  intrínseco. Como el resultado obtenido no era suficientemente informativo se optó por utilizar la construcción con las 2kb del promotor de *Mfn2* que carece de la región comprendida entre -532 y -352. Los resultados obtenidos mostraron que tal como se había descrito (Fig. 18 A) la construcción empleada no responde a PGC-1 $\alpha$ . La cotransfección con vectores de expresión de MEF2A o MEF2C junto con PGC-1 $\alpha$  mostraron un ligero incremento de la actividad transcripcional respecto a la activación que producía MEF2A o MEF2C en solitario (Fig. 36 B), pero difícilmente achacables a un efecto coactivador. El resultado obtenido en este modelo experimental no descarta que en el contexto de una fibra muscular PGC-1 $\alpha$  pueda coactivar a MEF2 al requerir esta coactivación alguna proteína o proteínas estabilizadoras del complejo MEF2-PGC-1 $\alpha$  que no se expresan en la línea celular 10T1/2.

Resultados



**Figura 36. PGC-1 $\alpha$  no coactiva a MEF2 en el promotor de *Mfn2*.** Células 10T1/2 fueron cotransfectadas con (panel A) la construcción -1982/+45-Luc o (panel B) la construcción -1982/+45-Luc con una deleción entre las bases -532/-352 y un vector de expresión de MEF2A, MEF2C o MEF2D en las combinaciones que se indican en la figura junto con un vector de expresión irrelevante (barras blancas) o para PGC-1 $\alpha$  (barras negras). A las 40 horas se determinó la actividad luciferasa como medida indirecta de actividad transcripcional. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos realizados por triplicado. \* Indica una diferencia estadísticamente significativa respecto a la transfección con el plásmido irrelevante.  $P < 0,05$ .

Reference List

- Bach,D., Pich,S., Soriano,F.X., Vega,N., Baumgartner,B., Oriola,J., Daugaard,J.R., Lloberas,J., Camps,M., Zierath,J.R., Rabasa-Lhoret,R., Wallberg-Henriksson,H., Laville,M., Palacin,M., Vidal,H., Rivera,F., Brand,M., and Zorzano,A. (2003a). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190-17197.
- Bach,D., Pich,S., Soriano,F.X., Vega,N., Baumgartner,B., Oriola,J., Daugaard,J.R., Lloberas,J., Camps,M., Zierath,J.R., Rabasa-Lhoret,R., Wallberg-Henriksson,H., Laville,M., Palacin,M., Vidal,H., Rivera,F., Brand,M., and Zorzano,A. (2003b). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* 278, 17190-17197.
- Carroll,S., Nicotera,P., and Pette,D. (1999). Calcium transients in single fibers of low-frequency stimulated fast-twitch muscle of rat. *Am. J. Physiol* 277, C1122-C1129.
- Czubryt,M.P., McAnally,J., Fishman,G.I., and Olson,E.N. (2003a). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha ) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 1711-1716.
- Czubryt,M.P., McAnally,J., Fishman,G.I., and Olson,E.N. (2003b). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha ) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 1711-1716.
- Czubryt,M.P., McAnally,J., Fishman,G.I., and Olson,E.N. (2003c). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha ) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 1711-1716.
- Li,J., Puceat,M., Perez-Terzic,C., Mery,A., Nakamura,K., Michalak,M., Krause,K.H., and Jaconi,M.E. (2002). Calreticulin reveals a critical Ca(2+) checkpoint in cardiac myofibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 158, 103-113.
- Lin,J., Wu,H., Tarr,P.T., Zhang,C.Y., Wu,Z., Boss,O., Michael,L.F., Puigserver,P., Isotani,E., Olson,E.N., Lowell,B.B., Bassel-Duby,R., and Spiegelman,B.M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797-801.
- McKinsey,T.A., Zhang,C.L., and Olson,E.N. (2002a). MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem. Sci.* 27, 40-47.
- McKinsey,T.A., Zhang,C.L., and Olson,E.N. (2002b). MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem. Sci.* 27, 40-47.
- Michael,L.F., Wu,Z., Cheatham,R.B., Puigserver,P., Adelmant,G., Lehman,J.J., Kelly,D.P., and Spiegelman,B.M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 3820-3825.



## Resultados

Mora,S. and Pessin,J.E. (2000). The MEF2A isoform is required for striated muscle-specific expression of the insulin-responsive GLUT4 glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **275**, 16323-16328.

Olson,E.N. and Williams,R.S. (2000). Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* **101**, 689-692.

Puigserver,P., Wu,Z., Park,C.W., Graves,R., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.

Santalucia,T., Moreno,H., Palacin,M., Yacoub,M.H., Brand,N.J., and Zorzano,A. (2001b). A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. *J. Mol. Biol.* **314**, 195-204.

Santalucia,T., Moreno,H., Palacin,M., Yacoub,M.H., Brand,N.J., and Zorzano,A. (2001c). A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. *J. Mol. Biol.* **314**, 195-204.

Santalucia,T., Moreno,H., Palacin,M., Yacoub,M.H., Brand,N.J., and Zorzano,A. (2001a). A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. *J. Mol. Biol.* **314**, 195-204.

Schiaffino,S. and Serrano,A. (2002a). Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 569-575.

Schiaffino,S. and Serrano,A. (2002b). Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 569-575.

Schiaffino,S. and Serrano,A. (2002c). Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 569-575.

Wu,H., Naya,F.J., McKinsey,T.A., Mercer,B., Shelton,J.M., Chin,E.R., Simard,A.R., Michel,R.N., Bassel-Duby,R., Olson,E.N., and Williams,R.S. (2000). MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J.* **19**, 1963-1973.

## 1. Caracterización del promotor de *Mfn2*.

El gen de *Mfn2* fue identificado en nuestro laboratorio en una búsqueda de genes con expresión alterada en condiciones de resistencia a la insulina (Bach et al., 2003). La información sobre *Mfn2* depositada en las bases de datos indicaba un único inicio de transcripción. La observación detallada de la región donde se hallaba el origen de transcripción evidenció la ausencia de caja TATA y una proporción muy alta de nucleótidos de C y G. Los programas predictores de islas CpG indicaron que el promotor proximal de *Mfn2* se hallaba en una isla CpG. Los dinucleótidos CpG se hallan pobremente representados en el genoma de muchos vertebrados pero existen regiones en el genoma de 0.5-2 kb que tienen una proporción relativamente alta de dinucleótidos CpG denominadas islas CpG (Bird, 2002). Existen evidencias que relacionan la metilación de promotores en islas CpG con la silenciación génica (Bird, 2002) y la impronta génica (Feil y Khosla, 1999). Esto sugiere que la expresión de *Mfn2* puede ser regulada por metilación. En estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, se ha detectado un polimorfismo en una sola base en el promotor de *Mfn2* en la que se sustituye la secuencia TG por CG lo que la hace susceptible de metilación. Mientras que en estado no metilado la actividad promotora es similar en ambos alelos, la metilación *in vitro* provoca una gran reducción en la actividad promotora en el alelo CG y no lo hace en el alelo TG (Naon D y Soriano FX, resultados no mostrados). Actualmente se está determinando si la metilación de esta secuencia se produce *in vivo*.

A pesar de que las islas CpG se han asociado con aproximadamente la mitad de los promotores de genes codificantes de proteínas, los elementos que le otorgan la función promotora basal están poco definidos. Una característica de estos promotores es la ausencia de la caja TATA y múltiples inicios de transcripción (Smale y Kadonaga, 2003). Por medio

## Discusión

de RACE, determinamos que la transcripción de *Mfn2* se iniciaba en al menos seis puntos, siendo especialmente mayoritarios los transcritos que se iniciaban en las cercanías del inicio de transcripción descrito hasta el momento y otro a +58 bp. La potencia de estos inicios de transcripción se debería verificar mediante otras técnicas como la de *primer extensión* pues el RACE se basa en la técnica de la PCR y la reacción puede favorecer los fragmentos más cortos. El uso de ensayos con genes reporteros permitió determinar la actividad transcripcional relativa de diversos fragmentos del promotor basal. Las construcciones que incluían el primer intrón de *Mfn2* mostraron mayor actividad transcripcional, posiblemente por la presencia de elementos reguladores en esta región. Los genes de la MHC-A y N-Ras pierden capacidad promotora cuyo se deleccionan secuencias a 3' del inicio de transcripción (Kawamoto, 1994; Jeffers y Pellicer, 1994), en ellos se encuentran los elementos denominados MED-1 (del inglés *Multiple Start site Element Downstream*). Los elementos MED-1 se han encontrado en genes con múltiples inicios de transcripción, la secuencia consenso es GCTCCC/G y se localizan a 3' del inicio de transcripción (Ince y Scotto, 1995). En el gen de *Mfn2* a +238 tiene una secuencia cercana al consenso, GCTCGG. No hay estudios que indiquen como puede afectar la sustitución de una base en la caja MED-1 a sus efectos transcripcionales. Tampoco se puede descartar en el gen de *Mfn2* la presencia de elementos a 3' que dirijan la RNA polimerasa II y aún no hayan sido descritos.

Otra característica de los promotores localizados en islas CpG es la presencia de múltiples lugares de unión al factor de transcripción Sp1, el cual se sugiere puede dirigir a la maquinaria basal de transcripción para formar el complejo de preiniciación en un margen de bp poco definidos (Smale y Kadonaga, 2003). Estudios de delección del promotor de *Mfn2* (construcción -1982/+45-Luc) en las líneas celulares 10T1/2, L6E9 y HeLa indicaron que la expresión de *Mfn2* depende de elementos reguladores activadores y represores que varían en las distintas líneas celulares, pero en todas ellas la secuencia comprendida entre -229 y -54 fue importante en la transcripción basal. Allí existen diversos lugares de unión a Sp1 el cual activa al promotor de *Mfn2* mientras que Sp3, como ya se ha descrito, lo reprime (Hagen et al., 1994; Majello et al., 1994b; Suske, 1999). Sp1 es un factor ubicuo relativamente poco regulado, pero recientemente se ha sugerido un papel de Sp1 en respuesta a determinadas señales extracelulares como la insulina (Samson y Wong, 2002).

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

La expresión de *Mfn2* se halla reprimida en músculo esquelético en condiciones de resistencia a la insulina, pero por los datos obtenidos por administración de insulina *in vitro* o con un modelo animal de diabetes de tipo 1 nos indican que la insulina no regula la expresión de *Mfn2* en músculo esquelético. El modelo animal a partir del que se identificó *Mfn2* fueron las ratas Zucker obesas *fa/fa* que tienen una mutación en el receptor de la leptina que le impide su activación en respuesta a la leptina. Los estudios de administración de leptina a miotubos L6E9 no modificaron la expresión de *Mfn2*, pero estos datos no excluyen el papel de la leptina en la regulación de la expresión génica de *Mfn2* dado que aunque el músculo esquelético expresa el receptor de la leptina y es sensible a ella (Minokoshi et al., 2002), los efectos de la leptina se producen principalmente en el sistema nervioso central, a través del hipotálamo (Flier, 2004).

Con el objetivo de realizar una criba del papel de diversos factores de transcripción en la regulación de la expresión de *Mfn2* se utilizó un plásmido en el que la expresión del gen reportero de la luciferasa lo dirigía la secuencia -1982/+45. De los seis inicios de transcripción identificados, esta secuencia sólo mantiene tres, el descrito inicialmente y otros dos, uno a 5' y otro a 3'. Esta construcción tiene una capacidad promotora fuerte, ligeramente superior a la del promotor del virus SV40.

Los niveles de expresión de *Mfn2* aumentan durante la diferenciación muscular y a adipocito. Se observó que factores clave en la diferenciación muscular como MyoD y MEF2 (Arnold y Winter, 1998) estimulaban notablemente la actividad promotora. Del papel de MEF2 en la regulación génica de *Mfn2* hablaremos más adelante. ROR $\alpha$ 2 es un receptor nuclear que se expresa abundantemente en músculo esquelético, aunque no hay ninguna evidencia de que regule la diferenciación miogénica (Giguere, 1999). La activación del promotor de *Mfn2* por ROR $\alpha$ 2 en células 10T1/2 fue muy modesta. El uso de otros modelos celulares ayudaría a esclarecer el posible papel de ROR $\alpha$ 2 en la regulación de la expresión de *Mfn2*.

En cuanto a la diferenciación adipocitaria se probaron dos factores de transcripción clave en el proceso de diferenciación, C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (Herrera et al., 1989; Lin y Lane, 1992; MacDougald y Lane, 1995). C/EBP $\alpha$  mostró un ligero incremento en la actividad transcripcional del promotor de *Mfn2* en fibroblastos 10T1/2. Es posible que el efecto activador de C/EBP $\alpha$  dependa del contexto celular en el que se expresa. La sobreexpresión

## Discusión

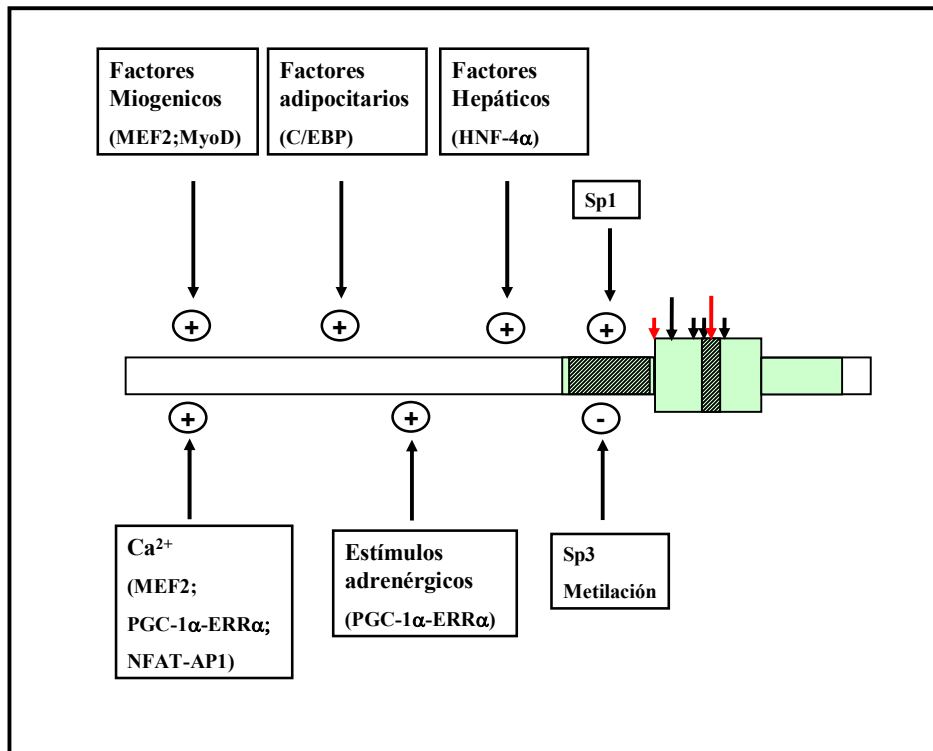
de PPAR $\gamma$  no modificó la actividad transcripcional del promotor de *Mfn2* en ensayos de genes reporteros, pero un resultado negativo no implica necesariamente que a nivel cromosómico dicho factor no regule la expresión de un gen, ya que dirigiendo al gen reportero sólo se pueden clonar unos pocos kb de un promotor y los elementos de respuesta a PPAR $\gamma$  pueden hallarse en *enhancers* a varias kb del inicio de transcripción como ocurre con el *enhancer* de UCP1 (Barbera et al., 2001; Mar Gonzalez-Barroso et al., 2000).

El hígado es uno de los tejidos donde *Mfn2* tiene expresión abundante (Bach et al., 2003). El receptor nuclear HNF-4 $\alpha$ , altamente expresado en hígado, activó fuertemente el promotor de *Mfn2*. La función de *Mfn2* en el hígado se desconoce, pero los datos conocidos de *Mfn2* como activador del metabolismo mitocondrial (Bach et al., 2003; Pich, 2004), el papel de HNF-4 $\alpha$  en la gluconeogénesis (Hall et al., 1995; Yoon et al., 2001) y que la gluconeogénesis sea un proceso dependiente de ATP nos permiten hipotetizar un papel importante de *Mfn2* en la gluconeogénesis. En futuros estudios se debe considerar el papel de HNF-4 $\alpha$  en la regulación de *Mfn2* en hígado en condiciones gluconeogénicas.

Los factores de transcripción AP-1 y NFAT2 no activaron el promotor de *Mfn2* por separado, pero la expresión de ambos factores produjo activación transcripcional. En nuestro modelo experimental AP-1 estaba formado por las proteínas c-Jun y c-Fos. De los dos miembros de AP-1, la presencia de c-Jun en combinación con NFAT2 fue suficiente para activar al promotor de *Mfn2*. Una situación fisiológica en la que se activan NFAT y AP-1 es por la pérdida de  $\Delta\Psi$ . En estas condiciones la mitocondria es incapaz de almacenar calcio y se produce un incremento en la concentración de calcio intracelular que activa a la calcineurina y a la JNK que a su vez activan a NFAT y c-Jun respectivamente (Biswas et al., 1999; Butow y Avadhani, 2004). Las fibras musculares de pacientes con enfermedades mitocondriales muestran activación de c-Jun (Pianese et al., 2002; Filosto et al., 2003). c-Jun se ha relacionado tanto con procesos proapoptóticos como antiapoptóticos (Shaulian y Karin, 2002). Recientemente se ha descrito el papel de *Mfn2* como proteína protectora de la apoptosis (Sugioka et al., 2004). La activación de NFAT y c-Jun como resultado de la pérdida de  $\Delta\Psi$  podría activar la transcripción de *Mfn2* que a su vez incrementaría el  $\Delta\Psi$  evitando la liberación del citocromo c y otras proteínas mitocondriales capaces de activar a las caspasas.

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

Los resultados presentados en esta sección nos sugieren mecanismos y factores de transcripción implicados en la regulación génica de *Mfn2* tales como la metilación, el papel de Sp1 en la transcripción basal y posibles factores de transcripción implicados en la regulación específica de tejido de *Mfn2* (Fig. 37). El papel de PGC-1 $\alpha$  y MEF2 se ha estudiado más detalladamente en las siguientes secciones.



**Figura 37. Representación esquemática del primer exón y extremos flanqueantes del gen humano de *Mfn2*.** El promotor basal de *Mfn2* se halla en una isla CpG (verde), que se extiende desde -260 a +360, abarcando todo el primer exón (rectángulo mayor). La situación del promotor en una isla CpG lo hace susceptible a regularse por metilación. En esta región existen diversas cajas de unión a factores de transcripción de la familia Sp. Dos regiones parecen especialmente responsables de la actividad promotora basal (rayado diagonal). La transcripción se inicia desde seis puntos diferentes (flechas sobre el primer exón) siendo dos los inicios predominantes (flechas mayores). De los seis inicios, dos poseen la secuencia consenso del elemento Inr (flechas rojas). Diversos estímulos fisiológicos y factores de transcripción pueden regular la expresión génica de *Mfn2* estimulándola (+) o reprimiéndola (-).

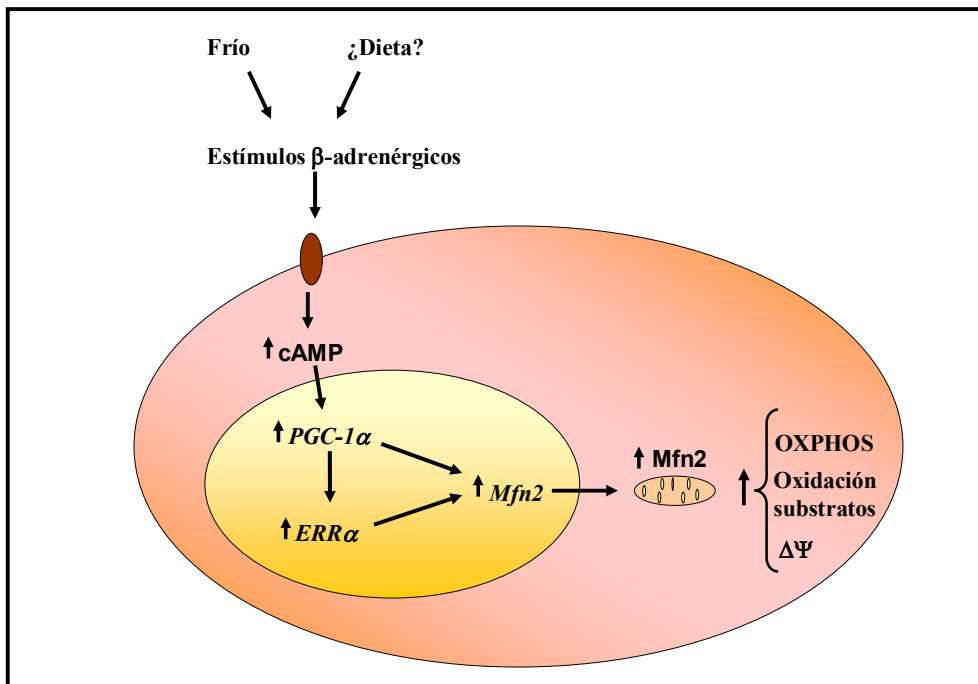
### **2. Mfn2 media el efecto estimulador de PGC-1 $\alpha$ sobre la actividad mitocondrial.**

Los datos presentados en esta sección muestran el incremento de la expresión de *Mfn2* en los principales tejidos termogénicos en mamíferos, TAM y músculo esquelético, en condiciones de elevado gasto energético. Los incrementos en la expresión de *Mfn2* en respuesta a la exposición al frío o a agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se producirían por el efecto coactivador de PGC-1 $\alpha$  sobre el promotor de *Mfn2* como se ha demostrado mediante la inducción de PGC-1 $\alpha$  con adenovirus recombinantes en miotubos L6E9, ensayos con genes reporteros e inmunoprecipitación de cromatina.

Recientemente el grupo de la Dra. Kralli determinó qué genes eran regulados por la sobreexpresión exógena de PGC-1 $\alpha$ . Los datos del *microarray*, no verificados por ninguna otra técnica, mostraron un incremento de dos veces en la expresión de *Mfn2* (Schreiber et al., 2004). La represión de PGC-1 $\alpha$  en condiciones de resistencia a la insulina y diabetes se ha asociado a la reducción de genes de la OXPHOS (Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003). En estas condiciones se produce una disminución en la expresión de *Mfn2* (Bach et al., 2003).

PGC-1 $\alpha$  fue descrito inicialmente como un coactivador de receptores nucleares (Puigserver et al., 1998) aunque el número de factores de transcripción de otras familias coactivados por PGC-1 $\alpha$  se ha ido incrementando en los últimos años (Knutti y Kralli, 2001; Puigserver y Spiegelman, 2003). Para determinar que factor de transcripción coactivaba PGC-1 $\alpha$  en el promotor de *Mfn2* recurrimos a mapar las 2 kp del promotor sobre el que se observó la acción de PGC-1 $\alpha$  en experimentos con genes reporteros. La región de 25 bp requerida para la coactivación por PGC-1 $\alpha$  se halla altamente conservada entre humanos y ratones lo que denota su importancia. En estos 25 bp se hallan tres cajas de unión a receptores nucleares. Mediante mutagénesis se determinó que sólo la denominada caja 2 es necesaria

para el efecto activador de PGC-1 $\alpha$  (Fig. 38). En ella puede unirse ERR $\alpha$ . Este receptor nuclear presenta las siguientes propiedades: a) se une establemente al DNA en forma de monómero (Johnston et al., 1997), b) se activa por PGC-1 $\alpha$  (Schreiber et al., 2003; Mootha et al., 2004), c) se induce en respuesta al frío (Schreiber et al., 2003) y otras condiciones donde aumenta la expresión de PGC-1 $\alpha$  (Ichida et al., 2002), d) presenta expresión ubicua, y abundantemente en los mismos tejidos en los que lo hace PGC-1 $\alpha$  (Puigserver y Spiegelman, 2003; Schreiber et al., 2003) y f) juega un papel en la inducción de genes involucrados en el metabolismo energético (Sladek et al., 1997; Vega y Kelly, 1997). Además, recientemente se ha demostrado que ERR $\alpha$  es un factor de transcripción clave en la regulación de genes de la OXPHOS y de la biogénesis mitocondrial por PGC-1 $\alpha$  (Mootha et al., 2004; Schreiber et al., 2004).



**Figura 38. Modelo esquemático de la activación transcripcional de *Mfn2* por estímulos adrenérgicos y sus consecuencias sobre el metabolismo mitocondrial.** Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos disparan cascadas de señalización que se inician con aumentos en los niveles citosólicos de cAMP. Como consecuencia de las cascadas de señalización aumenta la transcripción de PGC-1 $\alpha$  y se estabiliza y activa la proteína. Mediante un proceso de retroalimentación positivo, PGC-1 $\alpha$  estimula la transcripción de ERR $\alpha$ . PGC-1 $\alpha$  coactiva a ERR $\alpha$  en el promotor de *Mfn2* con lo que se incrementan los niveles de Mfn2 en la mitocondria. Esto, por un mecanismo aún no determinado, incrementa los niveles de moléculas del sistema OXPHOS, estimula la oxidación de sustratos y provoca incrementos en el potencial de membrana mitocondrial.



## Discusión

La región -432/-407 donde se halla la denominada caja 2 posee otros dos elementos de respuesta a receptores nucleares. Las cajas 2 y 3 forman un DR4 donde se ha descrito que se une el receptor de hormonas tiroideas (TR). La acción del cerebro sobre el gasto energético viene mediado por el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides. Variaciones en los niveles de hormona tiroidea se asocian con cambios en el consumo energético. Son varios los mecanismos por los que la hormona tiroidea estimula la termogénesis incluyendo ciclos fútiles de captación y liberación de sustratos e iones o activación de proteínas desacopladoras (Silva, 1995). Sin embargo, parte de la comunidad científica ha asumido un papel pasivo de las hormonas tiroideas en la termogénesis inducida por el frío. El principal argumento de los críticos ha sido que no parece haber modulación de los niveles de hormona tiroidea durante la exposición al frío (Lowell y Spiegelman, 2000). Sin querer entrar en la polémica, el resultado obtenido por la combinación TR $\alpha$ 1 y PGC-1 $\alpha$ , no sólo no potenció el efecto activador de PGC-1 $\alpha$  sino que lo anuló. Que tanto ERR $\alpha$  como TR $\alpha$ 1 fuesen capaces de unirse al mismo elemento en el promotor de *Mfn2* podría aportar una explicación a este resultado. La unión de estos NR se hallaría en equilibrio, un incremento en los niveles de ERR $\alpha$  como el que se produce en condiciones en las que se activa PGC-1 $\alpha$  (Ichida et al., 2002; Mootha et al., 2004; Schreiber et al., 2003) desplazaría el equilibrio hacia una mayor unión de ERR $\alpha$ . La posible unión de TR al promotor de *Mfn2* podría tener una relevancia fisiológica impidiendo una sobreexpresión de *Mfn2*, que pronosticamos que podría ser nociva, del mismo modo que el receptor de glucocorticoides inhibe la transcripción del gen de UCP1 para evitar una excesiva producción de calor (Soumano et al., 2000; Zakrzewska et al., 1999). Es de destacar que ERR $\alpha$  estimula la expresión del gen del TR $\alpha$  (Vanacker et al., 1998), pudiendo de este modo, producirse un proceso de retroalimentación negativo en la regulación de *Mfn2*. Basándonos en que la administración de T3 no modifica significativamente la activación del promotor de *Mfn2* por PGC-1 $\alpha$  no se puede descartar que el efecto observado sea debido a que la sobreexpresión de TR $\alpha$ 1 secuestre a PGC-1 $\alpha$  en otros lugares del genoma impidiendo la unión de PGC-1 $\alpha$  a ERR $\alpha$  en el promotor de *Mfn2*.

PGC-1 $\alpha$  forma parte de una pequeña familia de coactivadores con alta homología en sus extremos N- y C-terminal (Kelly y Scarpulla, 2004; Puigserver y Spiegelman, 2003). En el

extremo N-terminal poseen la secuencia LXXLL con la que interactúan con receptores nucleares. Si otros miembros de la familia de PGC-1 pueden regular la expresión de *Mfn2* se desconoce, pero el único miembro de la familia inducible por el frío es PGC-1 $\alpha$  (Yersson y Scarpulla, 2001; Lin et al., 2002a). Cabe destacar que PGC-1 $\beta$  promueve la mitocondriogénesis y la activación mitocondrial (St Pierre et al., 2003), que animales transgénicos de PGC-1 $\beta$  muestran un fenotipo con elevado gasto energético y resistencia a la obesidad inducida por la dieta y que PGC-1 $\beta$  interactúa con ERR $\alpha$  (Kamei et al., 2003).

PGC-1 $\alpha$  estimula la termogénesis en BAT incrementando los niveles de la proteína desacopladora UCP1 (Puigserver et al., 1998). La generación de calor en músculo esquelético mediado por PGC-1 $\alpha$  no es clara. Estudios bioenergéticos con PGC-1 $\alpha$  en células C2C12 han propuesto que PGC-1 $\alpha$  de algún modo no especificado aumentaría la actividad mitocondrial, incrementando el  $\Delta\Psi$  el cual se disiparía, dependiendo de los requerimientos energéticos de la célula, en forma de calor o para sintetizar ATP (St Pierre et al., 2003). La expresión de la ciclina T/Cdk9 en cardiomiocitos produce una disminución del  $\Delta\Psi$  que correlaciona con la represión de la expresión de PGC-1 $\alpha$  (Sano et al., 2004). La expresión exógena de PGC-1 $\alpha$  recupera los valores del  $\Delta\Psi$  (Sano et al., 2004). Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que variaciones en los niveles de *Mfn2* modifican la oxidación de glucosa y ácidos grasos así como la actividad de los complejos I, II, III y V de la cadena respiratoria provocando cambios en el  $\Delta\Psi$  (Bach et al., 2003; Pich, 2004). El mecanismo por el que *Mfn2* modifica la actividad mitocondrial está bajo estudio en nuestro laboratorio. Datos de la Dra. Pich han demostrado la coimmunoprecipitación de *Mfn2* con el complejo I y II. En esta tesis se ha mostrado que el incremento en el  $\Delta\Psi$  inducido por PGC-1 $\alpha$  requiere de la expresión inalterada de *Mfn2*. Para ello se han utilizado células 10T1/2 establemente transfectadas con un oligonucleótido antisentido de *Mfn2*. Estas células poseen unos niveles de *Mfn2* un 70% menor que las 10T1/2 sin que haya variaciones en la masa mitocondrial (Bach et al., 2003). Las diferencias metabólicas observadas en las células transfectadas establemente con el oligonucleótido antisentido se mantienen si el oligonucleótido antisentido es administrado exógenamente mediante adenovirus recombinantes (Bach et al., 2003). Estos datos nos

## Discusión

permiten descartar la posibilidad de que los efectos en el  $\Delta\Psi$  se deban a la inserción del oligonucleótido en algún punto delicado del genoma o una pérdida en la masa mitocondrial.

El papel energético de Mfn2 consistiría en activar el metabolismo mitocondrial para incrementar el  $\Delta\Psi$ . El  $\Delta\Psi$  sería utilizado por la célula para generar calor o ATP en función de las necesidades energéticas de la célula (Fig. 41).

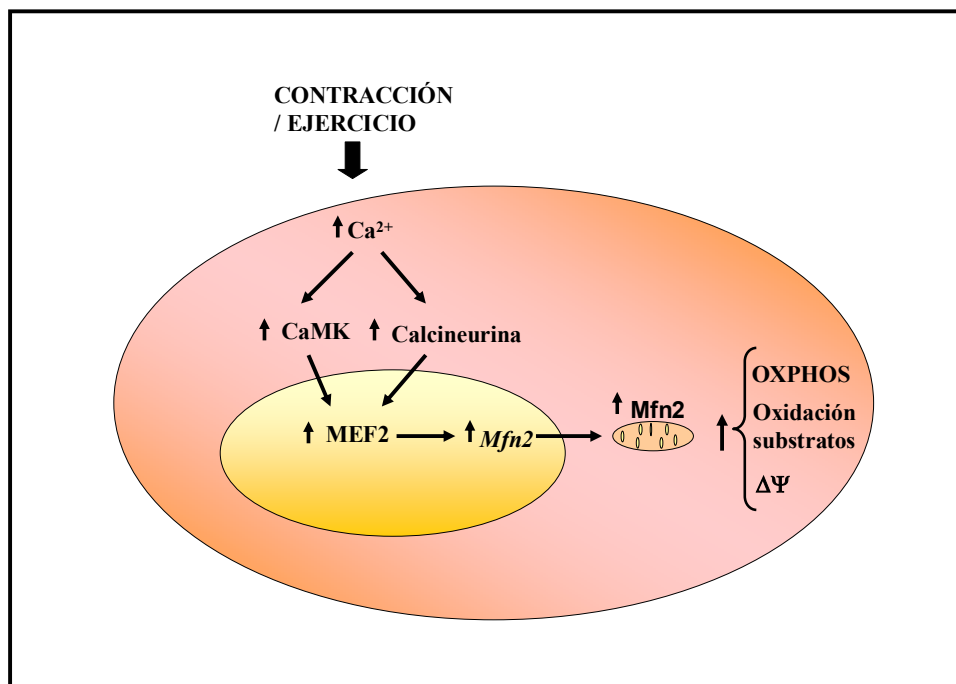
Todos estos datos en conjunto nos permiten proponer a Mfn2 como el principal efector en la activación mitocondrial inducida por PGC-1 $\alpha$ .

### **3. Papel de MEF2 en la regulación de *Mfn2* en fibras musculares oxidativas y glucolíticas.**

Los datos presentados muestran una mayor concentración de *Mfn2* por unidad de masa mitocondrial en fibras musculares oxidativas que en glucolíticas. La mayor expresión proteica correlaciona con mayor expresión génica de *Mfn2* en fibras musculares oxidativas. Estos resultados se observan tanto al comparar soleus con EDL como si lo que se compara es la fracción oxidativa con la glucolítica de gastrocnemius. Existe una extensa bibliografía que relaciona incrementos en la concentración de calcio intracelular, como consecuencia de la actividad neuromuscular, con los cambios en la expresión génica propios de los distintos tipos de fibras musculares (Berchtold et al., 2000; Hood, 2001; McKinsey et al., 2002; Olson y Williams, 2000a; Olson y Williams, 2000b; Schiaffino y Serrano, 2002; Wu et al., 2000). Así pues, elevaciones de la concentración de calcio intracelular, como consecuencia la actividad neuromuscular, podrían ser responsables de la expresión diferencial de *Mfn2* en las fibras musculares oxidativas y glucolíticas. Incrementos en la concentración de calcio intracelular mediante el ionóforo de calcio ionomicina duplicaron la expresión génica de *Mfn2* en miotubos L6E9. La elevación de  $Ca^{2+}$  intracelular activa la proteína fosfatasa calcineurina y la proteína quinasa CaMK (Fig. 39). La sobreexpresión de calcineurina o de CaMKIV en animales transgénicos estimulan la biogénesis mitocondrial (Wu et al., 2002). La actividad neuromuscular provoca la transición de fibras de contracción rápida a fibras de contracción lenta (Schiaffino y Serrano, 2002), en estas condiciones calcineurina activa a los factores de transcripción NFAT y MEF2 los cuales activan la expresión de genes propios de fibras musculares de tipo I (Naya et al., 2000; Wu et al., 2000; McCullagh et al., 2004). CaMK fosforila MEF2 aumentando su actividad transcripcional (Blaeser et al., 2000) o permitiendo la disociación con su represor HDAC de clase II (Lu et al., 2000; McKinsey et al., 2000). El posible papel de NFAT y/o MEF2 en la regulación de la

## Discusión

expresión de *Mfn2* se probó mediante ensayos con genes reporteros. Los datos obtenidos mostraron una clara activación del promotor de *Mfn2* por MEF2 A y C. Estudios delecionales del promotor de *Mfn2* nos permitieron determinar la presencia de una caja de unión a MEF2 entre las bases -910 y -901. MEF2 se une a esta caja como se demostró por mutagénesis, *band-shift* e inmunoprecipitación de cromatina. Estos datos nos sugieren que MEF2 puede ser uno de los principales efectores del calcio en la activación transcripcional de *Mfn2*. Los datos presentados no nos permiten determinar que vías de señalización activadas por calcio son responsables de la activación de MEF2.



**Figura 39. Modelo esquemático de la activación transcripcional de *Mfn2* por MEF2 como consecuencia de la actividad neuromuscular y sus consecuencias sobre el metabolismo mitocondrial.** Elevaciones en la concentración de calcio citosólico activan a la fosfatasa calcineurina y a la quinasa CaMK. Tanto Calcineurina como CaMK activan a MEF2 el cual se une al promotor de *Mfn2* estimulando su transcripción. Aumentos en los niveles mitocondriales de *Mfn2* incrementan los niveles de moléculas del sistema OXPHOS, estimula la oxidación de sustratos y provoca incrementos en el potencial de membrana mitocondrial.

La incapacidad de NFAT de activar al promotor de *Mfn2* en los ensayos con genes reporteros no descarta una posible función de NFAT *in vivo*. La falta de efecto de NFAT se puede deber a que el elemento de respuesta a NFAT se halle en una región distal del promotor de *Mfn2* que no se incluye en el plásmido reportero. Descartamos la posibilidad

de que en las condiciones experimentales el NFAT sobreexpresado se hallase fosforilado y por tanto tuviese localización citosólica por el hecho de que la transfección con NFAT2 y el posterior tratamiento con ionomicina no modificó la actividad transcripcional del promotor de *Mfn2* (resultados no mostrados). Los miembros de la familia NFAT requieren, posiblemente, la colaboración de otros factores de transcripción para poder ejercer su efecto activador de la transcripción (Crabtree y Olson, 2002; Horsley y Pavlath, 2002). En la primera sección vimos que la combinación de NFAT con MEF2 no activó al promotor de *Mfn2*, pero no se probó la combinación de NFAT con otros posibles factores de transcripción que no se expresan en el modelo celular utilizado y con los que colabora NFAT como GATA-2 (Musaro et al., 1999). La cooperación de NFAT con AP-1 ha sido estudiada extensamente en la regulación de genes del sistema inmune (Rao et al., 1997). En la primera sección hemos mostrado unos datos preliminares en los que la combinación c-Jun y NFAT2 son capaces de activar al promotor de *Mfn2*. El hecho que la *c-Jun N-terminal Kinasa* (JNK) y c-Jun se activan como consecuencia de la actividad muscular (Aronson et al., 1998; Puntschart et al., 1998; Sakamoto y Goodyear, 2002) y que la señalización por Ras promueve la expresión de genes propios de fibras musculares de contracción lenta (Murgia et al., 2000) induce a estudiar con más detalle la posible contribución de NFAT-AP-1 en la regulación de *Mfn2* en fibras musculares en respuesta al ejercicio.

El coactivador PGC-1 $\alpha$  muestra una mayor expresión en fibras musculares oxidativas que glucolíticas y promueve la transición de fibras musculares de tipo II a fibras musculares de tipo I (Lin et al., 2002b). Aunque la activación de AMPK en músculo esquelético induce aumentos en la expresión de PGC-1 $\alpha$  y CaMK (Zong et al., 2002), la expresión predominante de PGC-1 $\alpha$  en fibras musculares oxidativas se ha asociado a aumentos en la concentración de calcio intracelular y la activación de CaMK, calcineurina y MEF2 (Czubryt et al., 2003; Hyschin et al., 2003; Lin et al., 2002). En la sección anterior se mostró al coactivador PGC-1 $\alpha$  como un potente inductor de la transcripción de *Mfn2* en condiciones de aumento del gasto energético. Como se demostró, el efecto de PGC-1 $\alpha$  depende de la coactivación de ERR $\alpha$ . Se ha demostrado que MEF2 puede ser coactivado por PGC-1 $\alpha$  en el promotor de la MyHC, Glut4, CPT-1 $\beta$  y del propio PGC-1 $\alpha$  (Czubryt et al., 2003; Lin et al., 2002; Michael et al., 2001; Moore et al., 2003). La sobreexpresión de

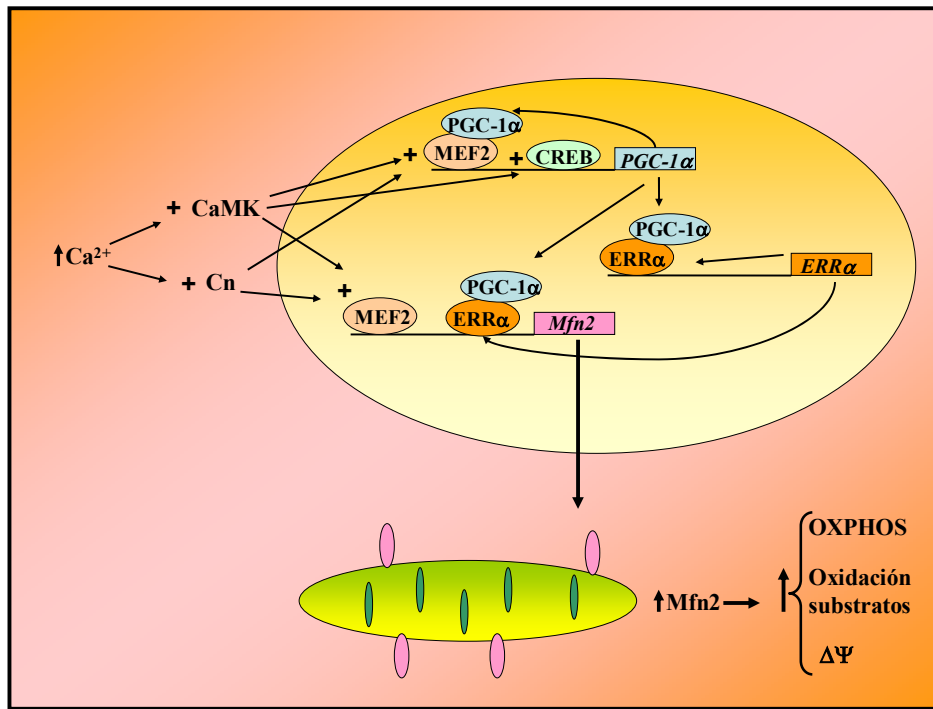
## Discusión

PGC-1 $\alpha$  y miembros de la familia MEF2 provocó un aumento en la actividad transcripcional del promotor de *Mfn2*, pero el efecto fue posiblemente aditivo, pues en construcciones que no responden a PGC-1 $\alpha$  sólo se observó un ligero incremento en la actividad transcripcional de células que sobreexpresaban MEF2C. Este incremento no parece ser efecto de una coactivación de PGC-1 $\alpha$  a MEF2C. PGC-1 $\alpha$  regula la transcripción de determinados factores de transcripción (Mootha et al., 2004; Wu et al., 1999), incrementos de algún factor de transcripción que colabora con MEF2C podrían explicar este fenómeno. La coactivación de PGC-1 $\alpha$  a un factor de transcripción determinado es específico de promotor (Lin et al., 2002b; Puigserver et al., 1998), pero no se puede excluir que en el contexto de una célula muscular PGC-1 $\alpha$  pueda coactivar a MEF2 en el promotor de *Mfn2*, pero para ello sea necesario la presencia de alguna o algunas proteínas que estabilicen la interacción entre MEF2 y PGC-1 $\alpha$ . La estimulación de CYP7A1 por PGC-1 $\alpha$  en hígado requiere la unión al DNA de varios receptores nucleares (Shin et al., 2003). Independientemente de la incapacidad de PGC-1 $\alpha$  para coactivar a MEF2 en el promotor de *Mfn2* en las condiciones experimentales utilizadas, cabe destacar la contribución de MEF2 y de PGC-1 $\alpha$ -ERR $\alpha$  en la mayor expresión de *Mfn2* en fibras musculares oxidativas (Fig. 40).

La mayoría de ratones con el gen de MEF2A deletado mueren durante las primeras semanas de vida y aquellos que llegan a la edad adulta son susceptibles a la muerte súbita. A nivel celular, los cardiomiocitos presentan desorganización mitocondrial, deficiencias y disfunción mitocondrial (Naya et al., 2002). La regulación de *Mfn2* por MEF2 y la función metabólica de *Mfn2* y de mantenimiento de la morfología mitocondrial sugieren que algunos rasgos fenotípicos del K.O. de MEF2A sean debidos a una expresión disminuida de *Mfn2*. En concordancia con estas observaciones, transgénicos con la actividad MEF2 cardiaca inhibida por una forma de HDAC5 resistente a la modificación por fosforilación sufren muerte súbita y presentan disfunción mitocondrial y cambios morfológicos en la arquitectura mitocondrial (Czubryt et al., 2003). Las mitocondrias de estos ratones transgénicos tienen una mayor superficie como se esperaría en una red mitocondrial fragmentada. En este sentido, la superficie mitocondrial de las ratas Zucker obesas, las cuales muestran disminuida la expresión de *Mfn2*, es mayor que en ratas Zucker delgadas (Bach et al., 2003). Además del papel metabólico y de mantenimiento de la red

## Regulación transcripcional del gen de mitofusina 2 en músculo esquelético

mitocondrial, recientemente se ha descrito una nueva función de Mfn2 como proteína antiproliferativa (Chen et al., 2004). El mecanismo por el que Mfn2 inhibe la proliferación es por interacción con Ras e inhibición de la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK1/2 (Chen et al., 2004). La activación de Ras-MAPK inicia cascadas de señalización importantes en el desarrollo patológico de la hipertrofia cardíaca (Hunter y Chien, 1999). La represión de Mfn2 en los KO de MEF2A podría ser parcialmente responsable de la dilatación ventricular observada en los neonatos deficientes en MEF2A (Naya et al., 2002). La determinación de los niveles de Mfn2 en el KO de MEF2A ayudaría a esclarecer estas cuestiones.

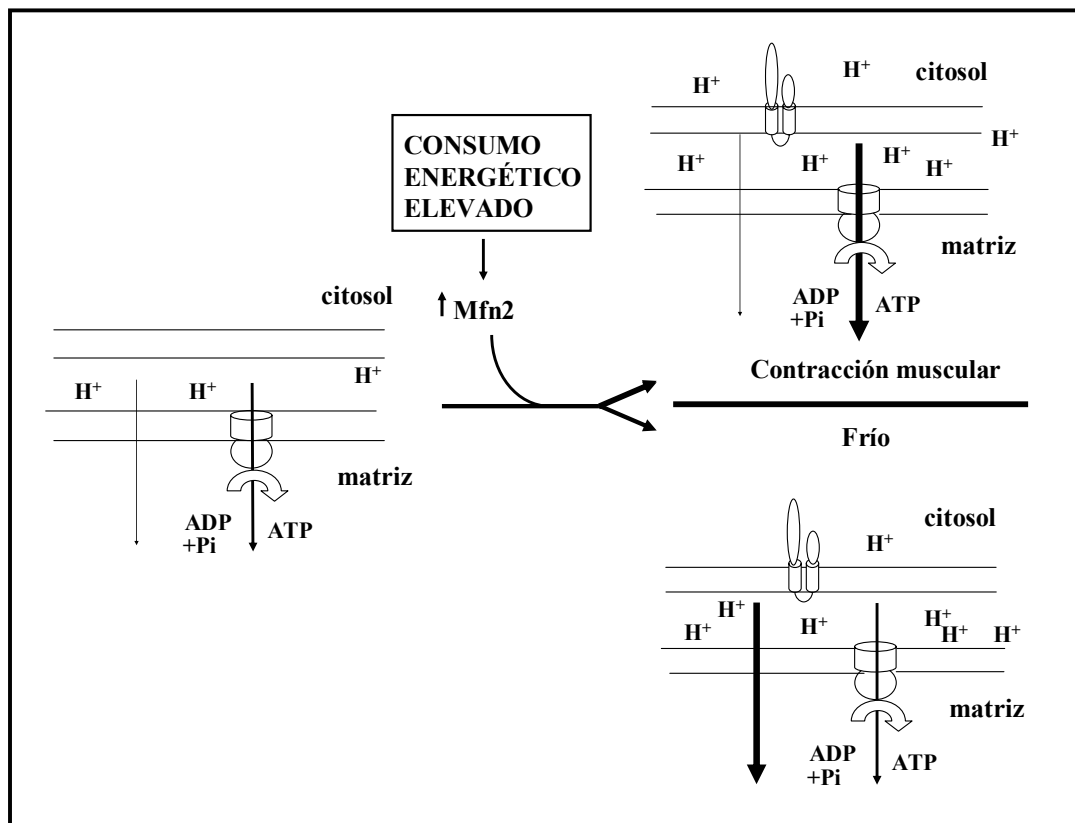


**Figura 40. Modelo integrado de la activación transcripcional de *Mfn2* como consecuencia de la actividad neuromuscular y sus consecuencias sobre el metabolismo mitocondrial.** Elevaciones en la concentración de calcio citosólico, como consecuencia de la actividad neuromuscular, activan a la fosfatasa calcineurina (Cn) y a la quinasa CaMK. La activación de Cn y CaMK inducen la expresión de PGC-1 $\alpha$  vía MEF2 y CREB. PGC-1 $\alpha$  promueve aumentos en los niveles de ERR $\alpha$  estimulando su transcripción. PGC-1 $\alpha$  coactiva a ERR $\alpha$  en el promotor de *Mfn2* y junto con MEF2, que se activa por Cn y CaMK, estimulan la transcripción de *Mfn2*. El aumento en los niveles mitocondriales de Mfn2 incrementa los niveles de moléculas del sistema OXPHOS, estimula la oxidación de sustratos y provoca incrementos en el potencial de membrana mitocondrial.



## Discusión

Los datos presentados aportan nuevas evidencias del papel de Mfn2 en el control de la oxidación mitocondrial de sustratos. Además, refuerzan la hipótesis de Mfn2 como proteína activadora del metabolismo mitocondrial. El incremento del  $\Delta\Psi$  asociado a incrementos en la expresión de Mfn2 podría ser desacoplado para generar calor y acoplado a la síntesis de ATP dependiendo de las necesidades de la célula (Fig. 41). En esta tesis se ha demostrado la inducción de *Mfn2* en dos condiciones en las que se requiere oxidación de sustratos, una en la que la respiración es desacoplada como es el caso de la exposición al frío y otra donde la respiración debe acoplarse a la síntesis de ATP como es el caso del músculo oxidativo que requiere energía para mantener el ritmo de la contracción muscular.



**Figura 42. Mfn2 incrementa el potencial de membrana mitocondrial que se puede utilizar para producir ATP o calor.** En condiciones de elevado gasto energético aumentan los niveles mitocondriales de Mfn2. Esto, estimula la oxidación de sustratos y provoca incrementos en el potencial de membrana mitocondrial. Dependiendo de la demanda celular de ATP, el potencial de membrana mitocondrial se disipa para producir ATP (contracción muscular) o generar calor (frío).

### Regulación transcripcional del gen de Mitofusina 2 en músculo esquelético

- 1) El promotor basal del gen de *Mfn2* no tiene caja TATA y se halla en una isla CpG, lo que lo hace susceptible a regulación por metilación. Como es común en los genes con el promotor basal localizado en una isla CpG, la transcripción de *Mfn2* en músculo esquelético se inicia en varios puntos en una ventana de 171 pares de bases. Sp1 podría tener un papel relevante dirigiendo a la maquinaria basal de transcripción para formar el complejo de preiniciación.
- 2) La expresión de *Mfn2* es mayor en tejidos con requerimientos energéticos elevados. Ensayos con genes reporteros han permitido identificar factores de transcripción que podrían ser responsables de la expresión dependiente de tejido
- 3) La expresión de *Mfn2* en músculo esquelético y tejido adiposo marrón aumenta con la exposición al frío y tratamiento con agonistas de los receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos, condiciones ambas caracterizadas por un elevado gasto energético. El aumento de expresión de *Mfn2* en estas condiciones es mediado por PGC-1 $\alpha$  el cual coactiva a ERR $\alpha$  que se une al promotor de *Mfn2* en forma de monómero entre las bases -413 y -408.
- 4) El incremento del potencial de membrana mitocondrial asociado a la expresión de PGC-1 $\alpha$  es inhibido por la represión de la expresión de *Mfn2*. *Mfn2* podría ser un efector crucial en la activación mitocondrial inducida por PGC-1 $\alpha$ .
- 5) *Mfn2* se expresa más abundantemente en fibras musculares oxidativas que en fibras glucolíticas. Esto aporta una nueva evidencia del papel de *Mfn2* en el control de la oxidación mitocondrial de sustratos.
- 6) La transcripción de *Mfn2* aumenta en respuesta a incrementos en la concentración de calcio intracelular. Nuestros resultados sugieren que MEF2, el cual se une y activa al promotor de *Mfn2*, podría ser un efector de la cascada de señalización iniciada por el calcio citosólico.

## Reference List

- Abbott, K.L., Friday, B.B., Thaloor, D., Murphy, T.J., and Pavlath, G.K. (1998). Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2905-2916.
- Akimoto, T., Ribar, T.J., Williams, R.S., and Yan, Z. (2004). Skeletal muscle adaptation in response to voluntary running in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV-deficient mice. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **287**, C1311-C1319.
- al Adsani, H., Hoffer, L.J., and Silva, J.E. (1997). Resting energy expenditure is sensitive to small dose changes in patients on chronic thyroid hormone replacement. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **82**, 1118-1125.
- Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (1988). Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* **107**, 481-495.
- Anderson, K.A. and Kane, C.D. (1998). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV and calcium signaling. *Biometals* **11**, 331-343.
- Andersson, U. and Scarpulla, R.C. (2001). Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **21**, 3738-3749.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R., and Martinou, J.C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370-372.
- Arnold, H.H. and Winter, B. (1998). Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 539-544.
- Aronson, D., Boppart, M.D., Dufresne, S.D., Fielding, R.A., and Goodyear, L.J. (1998). Exercise stimulates c-Jun NH2 kinase activity and c-Jun transcriptional activity in human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 106-110.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacin, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., and 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.
- Barbera, M.J., Schluter, A., Pedraza, N., Iglesias, R., Villarroya, F., and Giral, M. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J. Biol. Chem.* **276**, 1486-1493.
- Basanez, G., Nechushtan, A., Drozhinin, O., Chanturiya, A., Choe, E., Tutt, S., Wood, K.A., Hsu, Y., Zimmerberg, J., and Youle, R.J. (1999). Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 5492-5497.
- Berchtold, M.W., Brinkmeier, H., and Muntener, M. (2000). Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev.* **80**, 1215-1265.

Bereiter-Hahn, J. and Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27, 198-219.

Bergeron, R., Ren, J.M., Cadman, K.S., Moore, I.K., Perret, P., Pypaert, M., Young, L.H., Semenkovich, C.F., and Shulman, G.I. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 281, E1340-E1346.

Bernardi, P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* 79, 1127-1155.

Bhavsar, P.K., Dellow, K.A., Yacoub, M.H., Brand, N.J., and Barton, P.J. (2000). Identification of cis-acting DNA elements required for expression of the human cardiac troponin I gene promoter. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32, 95-108.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6-21.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.

Biswas, G., Adebajo, O.A., Freedman, B.D., Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M., and Avadhani, N.G. (1999). Retrograde Ca<sup>2+</sup> signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J.* 18, 522-533.

Black, B.L. and Olson, E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 167-196.

Blaeser, F., Ho, N., Prywes, R., and Chatila, T.A. (2000). Ca<sup>2+</sup>-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J. Biol. Chem.* 275, 197-209.

Bogenghagen, D.F. and Clayton, D.A. (2003). The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem. Sci.* 28, 357-360.

Boss, O., Bachman, E., Vidal-Puig, A., Zhang, C.Y., Peroni, O., and Lowell, B.B. (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.

Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Marcellus, R.C., and Shore, G.C. (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J. Cell Biol.* 160, 1115-1127.

Bushdid, P.B., Osinska, H., Waclaw, R.R., Molkentin, J.D., and Yutzey, K.E. (2003). NFATc3 and NFATc4 are required for cardiac development and mitochondrial function. *Circ. Res.* 92, 1305-1313.

Butler, J.E. and Kadonaga, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* 16, 2583-2592.

Butow, R.A. and Avadhani, N.G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol. Cell* 14, 1-15.

Carroll, S., Nicotera, P., and Pette, D. (1999). Calcium transients in single fibers of low-frequency stimulated fast-twitch muscle of rat. *Am. J. Physiol* 277, C1122-C1129.

- Chau,C.M., Evans,M.J., and Scarpulla,R.C. (1992). Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *J. Biol. Chem.* **267**, 6999-7006.
- Chawla,S., Hardingham,G.E., Quinn,D.R., and Bading,H. (1998). CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* **281**, 1505-1509.
- Chen,H., Detmer,S.A., Ewald,A.J., Griffin,E.E., Fraser,S.E., and Chan,D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* **160**, 189-200.
- Chen,K.H., Guo,X., Ma,D., Guo,Y., Li,Q., Yang,D., Li,P., Qiu,X., Wen,S., Xiao,R.P., and Tang,J. (2004). Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat. Cell Biol.* **6**, 872-883.
- Chin,E.R., Olson,E.N., Richardson,J.A., Yang,Q., Humphries,C., Shelton,J.M., Wu,H., Zhu,W., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* **12**, 2499-2509.
- Chung,J.G., Yeh,K.T., Wu,S.L., Hsu,N.Y., Chen,G.W., Yeh,Y.W., and Ho,H.C. (2001). Novel transmembrane GTPase of non-small cell lung cancer identified by mRNA differential display. *Cancer Res.* **61**, 8873-8879.
- Clayton,D.A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Hum. Reprod.* **15 Suppl 2:11-7.**, 11-17.
- Cleeter,M.W., Cooper,J.M., Darley-Usmar,V.M., Moncada,S., and Schapira,A.H. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* **345**, 50-54.
- Crabtree,G.R. and Olson,E.N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**, S67-S79.
- Czubryt,M.P., McAnally,J., Fishman,G.I., and Olson,E.N. (2003). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha ) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 1711-1716.
- Dairaghi,D.J., Shadel,G.S., and Clayton,D.A. (1995). Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *J. Mol. Biol.* **249**, 11-28.
- Desagher,S. and Martinou,J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **10**, 369-377.
- Eggers,A., Caudevilla,C., Asins,G., Hegardt,F.G., and Serra,D. (2000). Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase promoter contains a CREB binding site that regulates cAMP action in Caco-2 cells. *Biochem. J.* **345 Pt 2:201-6.**, 201-206.
- Enriquez,J.A., Fernandez-Silva,P., Garrido-Perez,N., Lopez-Perez,M.J., Perez-Martos,A., and Montoya,J. (1999). Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone. *Mol. Cell Biol.* **19**, 657-670.

- Falkenberg,M., Gaspari,M., Rantanen,A., Trifunovic,A., Larsson,N.G., and Gustafsson,C.M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat. Genet.* **31**, 289-294.
- Fan,M., Rhee,J., St Pierre,J., Handschin,C., Puigserver,P., Lin,J., Jaeger,S., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Spiegelman,B.M. (2004). Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes Dev.* **18**, 278-289.
- Feil,R. and Khosla,S. (1999). Genomic imprinting in mammals: an interplay between chromatin and DNA methylation? *Trends Genet.* **15**, 431-435.
- Filosto,M., Tonin,P., Vattemi,G., Savio,C., Rizzuto,N., and Tomelleri,G. (2003). Transcription factors c-Jun/activator protein-1 and nuclear factor-kappa B in oxidative stress response in mitochondrial diseases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **29**, 52-59.
- Fisher,R.P. and Clayton,D.A. (1985). A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J. Biol. Chem.* **260**, 11330-11338.
- Fisher,R.P., Topper,J.N., and Clayton,D.A. (1987). Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements. *Cell* **50**, 247-258.
- Flier,J.S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* **116**, 337-350.
- Frank,S., Gaume,B., Bergmann-Leitner,E.S., Leitner,W.W., Robert,E.G., Catez,F., Smith,C.L., and Youle,R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* **1**, 515-525.
- Freyssenet,D., Di Carlo,M., and Hood,D.A. (1999). Calcium-dependent regulation of cytochrome c gene expression in skeletal muscle cells. Identification of a protein kinase c-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 9305-9311.
- Fritz,S., Rapaport,D., Klanner,E., Neupert,W., and Westermann,B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* **152**, 683-692.
- Gardiner-Garden,M. and Frommer,M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196**, 261-282.
- Garesse,R. and Vallejo,C.G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**, 1-16.
- Giguere,V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* **20**, 689-725.
- Glass,C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* **15**, 391-407.
- Gomez-Ambrosi,J., Fruhbeck,G., and Martinez,J.A. (2001). Rapid in vivo PGC-1 mRNA upregulation in brown adipose tissue of Wistar rats by a beta(3)-adrenergic agonist and lack of effect of leptin. *Mol. Cell Endocrinol.* **176**, 85-90.

- Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Griparic,L. and van der Blik,A.M. (2001). The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic.* 2, 235-244.
- Gugneja,S. and Scarpulla,R.C. (1997). Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J. Biol. Chem.* 272, 18732-18739.
- Gugneja,S., Virbasius,C.M., and Scarpulla,R.C. (1996). Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription. *Mol. Cell Biol.* 16, 5708-5716.
- Gulick,T., Cresci,S., Caira,T., Moore,D.D., and Kelly,D.P. (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 11012-11016.
- Hagen,G., Muller,S., Beato,M., and Suske,G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J.* 13, 3843-3851.
- Hales,K.G. and Fuller,M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121-129.
- Hall,R.K., Sladek,F.M., and Granner,D.K. (1995). The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 412-416.
- Handschin,C., Rhee,J., Lin,J., Tarr,P.T., and Spiegelman,B.M. (2003). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7111-7116.
- Heddi,A., Lestienne,P., Wallace,D.C., and Stepien,G. (1993). Mitochondrial DNA expression in mitochondrial myopathies and coordinated expression of nuclear genes involved in ATP production. *J. Biol. Chem.* 268, 12156-12163.
- Hermann,G.J., Thatcher,J.W., Mills,J.P., Hales,K.G., Fuller,M.T., Nunnari,J., and Shaw,J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* 143, 359-373.
- Herrera,R., Ro,H.S., Robinson,G.S., Xanthopoulos,K.G., and Spiegelman,B.M. (1989). A direct role for C/EBP and the AP-1-binding site in gene expression linked to adipocyte differentiation. *Mol. Cell Biol.* 9, 5331-5339.
- Herzig,R.P., Scacco,S., and Scarpulla,R.C. (2000). Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 275, 13134-13141.
- Hood,D.A. (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* 90, 1137-1157.
- Horsley,V. and Pavlath,G.K. (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biol.* 156, 771-774.

Hsu,Y.T., Wolter,K.G., and Youle,R.J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 3668-3672.

Hunter,J.J. and Chien,K.R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N. Engl. J. Med.* *341*, 1276-1283.

Huo,L. and Scarpulla,R.C. (2001). Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol. Cell Biol.* *21*, 644-654.

Ichida,M., Nemoto,S., and Finkel,T. (2002). Identification of a specific molecular repressor of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma Coactivator-1 alpha (PGC-1alpha). *J. Biol. Chem.* *277*, 50991-50995.

Ince,T.A. and Scotto,K.W. (1995). A conserved downstream element defines a new class of RNA polymerase II promoters. *J. Biol. Chem.* *270*, 30249-30252.

Jeffers,M. and Pellicer,A. (1994). Identification of multiple promoters within the N-ras proto-oncogene. *Biochim. Biophys. Acta* *1219*, 623-635.

Johnston,S.D., Liu,X., Zuo,F., Eisenbraun,T.L., Wiley,S.R., Kraus,R.J., and Mertz,J.E. (1997). Estrogen-related receptor alpha 1 functionally binds as a monomer to extended half-site sequences including ones contained within estrogen-response elements. *Mol. Endocrinol.* *11*, 342-352.

Kamei,Y., Ohizumi,H., Fujitani,Y., Nemoto,T., Tanaka,T., Takahashi,N., Kawada,T., Miyoshi,M., Ezaki,O., and Kakizuka,A. (2003). PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 12378-12383.

Kane,C.D. and Means,A.R. (2000). Activation of orphan receptor-mediated transcription by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase IV. *EMBO J.* *19*, 691-701.

Karbowski,M., Lee,Y.J., Gaume,B., Jeong,S.Y., Frank,S., Nechushtan,A., Santel,A., Fuller,M., Smith,C.L., and Youle,R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* *159*, 931-938.

Karbowski,M. and Youle,R.J. (2003). Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death. Differ.* *10*, 870-880.

Kawamoto,S. (1994). Evidence for an internal regulatory region in a human nonmuscle myosin heavy chain gene. *J. Biol. Chem.* *269*, 15101-15110.

Kay,B.K., Williamson,M.P., and 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.

Kelly,D.P. and Scarpulla,R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* *18*, 357-368.

Knutti,D. and Kralli,A. (2001). PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol. Metab* *12*, 360-365.

Koshiba,T., Detmer,S.A., Kaiser,J.T., Chen,H., McCaffery,J.M., and Chan,D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* *305*, 858-862.



Kressler,D., Schreiber,S.N., Knutti,D., and Kralli,A. (2002). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **277**, 13918-13925.

LaMarco,K.L. and McKnight,S.L. (1989). Purification of a set of cellular polypeptides that bind to the purine-rich cis-regulatory element of herpes simplex virus immediate early genes. *Genes Dev.* **3**, 1372-1383.

Landsberg,L., Saville,M.E., and Young,J.B. (1984). Sympathoadrenal system and regulation of thermogenesis. *Am. J. Physiol* **247**, E181-E189.

Larsson,N.G., Oldfors,A., Holme,E., and Clayton,D.A. (1994). Low levels of mitochondrial transcription factor A in mitochondrial DNA depletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1374-1381.

Lee,Y., Nadal-Ginard,B., Mahdavi,V., and Izumo,S. (1997). Myocyte-specific enhancer factor 2 and thyroid hormone receptor associate and synergistically activate the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2745-2755.

Legros,F., Lombes,A., Frachon,P., and 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.

Lehman,J.J., Barger,P.M., Kovacs,A., Saffitz,J.E., Medeiros,D.M., and Kelly,D.P. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest* **106**, 847-856.

Li,B., Holloszy,J.O., and Semenkovich,C.F. (1999). Respiratory uncoupling induces delta-aminolevulinate synthase expression through a nuclear respiratory factor-1-dependent mechanism in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 17534-17540.

Li,J., Puceat,M., Perez-Terzic,C., Mery,A., Nakamura,K., Michalak,M., Krause,K.H., and Jaconi,M.E. (2002). Calreticulin reveals a critical Ca(2+) checkpoint in cardiac myofibrillogenesis. *J. Cell Biol.* **158**, 103-113.

Lin,F.T. and Lane,M.D. (1992). Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev.* **6**, 533-544.

Lin,J., Puigserver,P., Donovan,J., Tarr,P., and Spiegelman,B.M. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* **277**, 1645-1648.

Lin,J., Tarr,P.T., Yang,R., Rhee,J., Puigserver,P., Newgard,C.B., and Spiegelman,B.M. (2003). PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**, 30843-30848.

Lin,J., Wu,H., Tarr,P.T., Zhang,C.Y., Wu,Z., Boss,O., Michael,L.F., Puigserver,P., Isotani,E., Olson,E.N., Lowell,B.B., Bassel-Duby,R., and Spiegelman,B.M. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797-801.

Lin,J., Wu,P.H., Tarr,P.T., Lindenberg,K.S., St Pierre,J., Zhang,C.Y., Mootha,V.K., Jager,S., Vianna,C.R., Reznick,R.M., Cui,L., Manieri,M., Donovan,M.X., Wu,Z., Cooper,M.P., Fan,M.C., Rohas,L.M., Zavacki,A.M., Cinti,S., Shulman,G.I., Lowell,B.B., Krainc,D., and Spiegelman,B.M. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* **119**, 121-135.

Liu,Y., Cseresnyes,Z., Randall,W.R., and Schneider,M.F. (2001). Activity-dependent nuclear translocation and intranuclear distribution of NFATc in adult skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* 155, 27-39.

Louet,J.F., Hayhurst,G., Gonzalez,F.J., Girard,J., and Decaux,J.F. (2002). The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J. Biol. Chem.* 277, 37991-38000.

Lowell,B.B. and Spiegelman,B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652-660.

Lu,J., McKinsey,T.A., Nicol,R.L., and Olson,E.N. (2000). Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4070-4075.

Luo,J., Sladek,R., Carrier,J., Bader,J.A., Richard,D., and Giguere,V. (2003). Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Mol. Cell Biol.* 23, 7947-7956.

MacDougald,O.A. and Lane,M.D. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 64:345-73., 345-373.

Macian,F., Lopez-Rodriguez,C., and Rao,A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476-2489.

Majello,B., De Luca,P., Hagen,G., Suske,G., and Lania,L. (1994). Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 22, 4914-4921.

Mar Gonzalez-Barroso,M., Pecqueur,C., Gelly,C., Sanchis,D., Alves-Guerra,M.C., Bouillaud,F., Ricquier,D., and Cassard-Doulcier,A.M. (2000). Transcriptional activation of the human ucp1 gene in a rodent cell line. Synergism of retinoids, isoproterenol, and thiazolidinedione is mediated by a multipartite response element. *J. Biol. Chem.* 275, 31722-31732.

Martin,J.F., Miano,J.M., Hustad,C.M., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Olson,E.N. (1994). A Mef2 gene that generates a muscle-specific isoform via alternative mRNA splicing. *Mol. Cell Biol.* 14, 1647-1656.

McCullagh,K.J., Calabria,E., Pallafacchina,G., Ciciliot,S., Serrano,A.L., Argentini,C., Kalhovde,J.M., Lomo,T., and Schiaffino,S. (2004). NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 10590-10595.

McCulloch,V., Seidel-Rogol,B.L., and Shadel,G.S. (2002). A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol. Cell Biol.* 22, 1116-1125.

McCulloch,V. and Shadel,G.S. (2003). Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Mol. Cell Biol.* 23, 5816-5824.

McKinsey,T.A., Zhang,C.L., Lu,J., and Olson,E.N. (2000). Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106-111.

McKinsey,T.A., Zhang,C.L., and Olson,E.N. (2002). MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem. Sci.* 27, 40-47.

Meeusen,S., McCaffery,J.M., and Nunnari,J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747-1752.

Michael,L.F., Wu,Z., Cheatham,R.B., Puigserver,P., Adelmant,G., Lehman,J.J., Kelly,D.P., and Spiegelman,B.M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 3820-3825.

Minokoshi,Y., Kim,Y.B., Peroni,O.D., Fryer,L.G., Muller,C., Carling,D., and Kahn,B.B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339-343.

Missbach,M., Jagher,B., Sigg,I., Nayeri,S., Carlberg,C., and Wiesenberg,I. (1996). Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha with potent antiarthritic activity. *J. Biol. Chem.* 271, 13515-13522.

Miura,S., Kai,Y., Ono,M., and Ezaki,O. (2003). Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha down-regulates GLUT4 mRNA in skeletal muscles. *J. Biol. Chem.* 278, 31385-31390.

Monsalve,M., Wu,Z., Adelmant,G., Puigserver,P., Fan,M., and Spiegelman,B.M. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol. Cell* 6, 307-316.

Moore,M.L., Park,E.A., and McMillin,J.B. (2003). Upstream stimulatory factor represses the induction of carnitine palmitoyltransferase-1beta expression by PGC-1. *J. Biol. Chem.* 278, 17263-17268.

Mootha,V.K., Handschin,C., Arlow,D., Xie,X., St Pierre,J., Sihag,S., Yang,W., Altshuler,D., Puigserver,P., Patterson,N., Willy,P.J., Schulman,I.G., Heyman,R.A., Lander,E.S., and Spiegelman,B.M. (2004). ERRalpha and GABPA/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6570-6575.

Mootha,V.K., Lindgren,C.M., Eriksson,K.F., Subramanian,A., Sihag,S., Lehar,J., Puigserver,P., Carlsson,E., Ridderstrale,M., Laurila,E., Houstis,N., Daly,M.J., Patterson,N., Mesirov,J.P., Golub,T.R., Tamayo,P., Spiegelman,B., Lander,E.S., Hirschhorn,J.N., Altshuler,D., and Groop,L.C. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267-273.

Mora,S. and Pessin,J.E. (2000). The MEF2A isoform is required for striated muscle-specific expression of the insulin-responsive GLUT4 glucose transporter. *J. Biol. Chem.* 275, 16323-16328.

Mozdy,A.D. and Shaw,J.M. (2003). A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 468-478.

Murgia,M., Serrano,A.L., Calabria,E., Pallafacchina,G., Lomo,T., and Schiaffino,S. (2000). Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. *Nat. Cell Biol.* 2, 142-147.

Musaro, A., McCullagh, K.J., Naya, F.J., Olson, E.N., and Rosenthal, N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400, 581-585.

Naar, A.M., Lemon, B.D., and Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 70:475-501., 475-501.

Nadal-Ginard, B. (1978). Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell* 15, 855-864.

Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I., and Hayashi, J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat. Med.* 7, 934-940.

Naya, F.J., Black, B.L., Wu, H., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2002). Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. *Nat. Med.* 8, 1303-1309.

Naya, F.J., Mercer, B., Shelton, J., Richardson, J.A., Williams, R.S., and Olson, E.N. (2000). Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *J. Biol. Chem.* 275, 4545-4548.

Nechushtan, A., Smith, C.L., Lamensdorf, I., Yoon, S.H., and Youle, R.J. (2001). Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J. Cell Biol.* 153, 1265-1276.

Nisoli, E., Clementi, E., Moncada, S., and Carruba, M.O. (2004). Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1-15.

Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S., and Carruba, M.O. (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299, 896-899.

Ojuka, E.O., Jones, T.E., Han, D.H., Chen, M., and Holloszy, J.O. (2003). Raising Ca<sup>2+</sup> in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J.* 17, 675-681.

Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., Ducommun, B., Lenaers, G., and Belenguer, P. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* 523, 171-176.

Olson, E.N. and Williams, R.S. (2000a). Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* 101, 689-692.

Olson, E.N. and Williams, R.S. (2000b). Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays* 22, 510-519.

Parisi, M.A., Xu, B., and Clayton, D.A. (1993). A human mitochondrial transcriptional activator can functionally replace a yeast mitochondrial HMG-box protein both in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.* 13, 1951-1961.

Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F.J., Nicol, R.L., McKinsey, T.A., Overbeek, P., Richardson, J.A., Grant, S.R., and Olson, E.N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac

hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J. Clin. Invest* **105**, 1395-1406.

Patti,M.E., Butte,A.J., Crunkhorn,S., Cusi,K., Berria,R., Kashyap,S., Miyazaki,Y., Kohane,I., Costello,M., Saccone,R., Landaker,E.J., Goldfine,A.B., Mun,E., DeFronzo,R., Finlayson,J., Kahn,C.R., and Mandarino,L.J. (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 8466-8471.

Pianese,L., Busino,L., De,B., I, De Cristofaro,T., Lo Casale,M.S., Giuliano,P., Monticelli,A., Turano,M., Criscuolo,C., Filla,A., Varrone,S., and Coccozza,S. (2002). Up-regulation of c-Jun N-terminal kinase pathway in Friedreich's ataxia cells. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2989-2996.

Picard,F., Gehin,M., Annicotte,J., Rocchi,S., Champy,M.F., O'Malley,B.W., Chambon,P., and Auwerx,J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* **111**, 931-941.

Pich, S (2004) Paper de Mitofusina-2 en el manteniment i el metabolisme de la xarxa mitocondrial. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.

Poulton,J., Morten,K., Freeman-Emmerson,C., Potter,C., Sewry,C., Dubowitz,V., Kidd,H., Stephenson,J., Whitehouse,W., and Hansen,F.J. (1994). Deficiency of the human mitochondrial transcription factor h-mtTFA in infantile mitochondrial myopathy is associated with mtDNA depletion. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1763-1769.

Puigserver,P., Adelmant,G., Wu,Z., Fan,M., Xu,J., O'Malley,B., and Spiegelman,B.M. (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* **286**, 1368-1371.

Puigserver,P., Rhee,J., Donovan,J., Walkey,C.J., Yoon,J.C., Oriente,F., Kitamura,Y., Altomonte,J., Dong,H., Accili,D., and Spiegelman,B.M. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**, 550-555.

Puigserver,P., Rhee,J., Lin,J., Wu,Z., Yoon,J.C., Zhang,C.Y., Krauss,S., Mootha,V.K., Lowell,B.B., and Spiegelman,B.M. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol. Cell* **8**, 971-982.

Puigserver,P. and Spiegelman,B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* **24**, 78-90.

Puigserver,P., Wu,Z., Park,C.W., Graves,R., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.

Puntschart,A., Claassen,H., Jostarndt,K., Hoppeler,H., and Billeter,R. (1995). mRNAs of enzymes involved in energy metabolism and mtDNA are increased in endurance-trained athletes. *Am. J. Physiol* **269**, C619-C625.

Puntschart,A., Wey,E., Jostarndt,K., Vogt,M., Wittwer,M., Widmer,H.R., Hoppeler,H., and Billeter,R. (1998). Expression of fos and jun genes in human skeletal muscle after exercise. *Am. J. Physiol* **274**, C129-C137.

Rao,A., Luo,C., and Hogan,P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:707-47., 707-747.

- Rapaport,D., Brunner,M., Neupert,W., and Westermann,B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 20150-20155.
- Ristevski,S., O'Leary,D.A., Thornell,A.P., Owen,M.J., Kola,I., and Hertzog,P.J. (2004). The ETS transcription factor GABPalpha is essential for early embryogenesis. *Mol. Cell Biol.* **24**, 5844-5849.
- Rojo,M., Legros,F., Chateau,D., and Lombes,A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* **115**, 1663-1674.
- Rosen,E.D., Walkey,C.J., Puigserver,P., and Spiegelman,B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 1293-1307.
- Sakamoto,K. and Goodyear,L.J. (2002). Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* **93**, 369-383.
- Samson,S.L. and Wong,N.C. (2002). Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 265-279.
- Sano,M., Wang,S.C., Shirai,M., Scaglia,F., Xie,M., Sakai,S., Tanaka,T., Kulkarni,P.A., Barger,P.M., Youker,K.A., Taffet,G.E., Hamamori,Y., Michael,L.H., Craigen,W.J., and Schneider,M.D. (2004). Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *EMBO J.* **23**, 3559-3569.
- Santalucia,T., Moreno,H., Palacin,M., Yacoub,M.H., Brand,N.J., and Zorzano,A. (2001). A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. *J. Mol. Biol.* **314**, 195-204.
- Santel,A., Frank,S., Gaume,B., Herrler,M., Youle,R.J., and Fuller,M.T. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J. Cell Sci.* **116**, 2763-2774.
- Santel,A. and Fuller,M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* **114**, 867-874.
- Satoh,M., Hamamoto,T., Seo,N., Kagawa,Y., and Endo,H. (2003). Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 482-493.
- Scarpulla,R.C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**, 1-14.
- Schiaffino,S. and Serrano,A. (2002). Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 569-575.
- Schlesinger,P.H., Gross,A., Yin,X.M., Yamamoto,K., Saito,M., Waksman,G., and Korsmeyer,S.J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 11357-11362.
- Schreiber,S.N., Emter,R., Hock,M.B., Knutti,D., Cardenas,J., Podvinec,M., Oakeley,E.J., and Kralli,A. (2004). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 6472-6477.

- Schreiber,S.N., Knutti,D., Brogli,K., Uhlmann,T., and Kralli,A. (2003). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J. Biol. Chem.* 278, 9013-9018.
- Sesaki,H. and Jensen,R.E. (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 152, 1123-1134.
- Sesaki,H. and Jensen,R.E. (2004). Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J. Biol. Chem.* 279, 28298-28303.
- Shaulian,E. and Karin,M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131-E136.
- Shaw,J.M. and Nunnari,J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* 12, 178-184.
- Shin,D.J., Campos,J.A., Gil,G., and Osborne,T.F. (2003). PGC-1alpha activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 50047-50052.
- Silva,J.E. (1995). Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5, 481-492.
- Silva,J.E. and Rabelo,R. (1997). Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur. J. Endocrinol.* 136, 251-264.
- Skulachev,V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* 26, 23-29.
- Sladek,R., Bader,J.A., and Giguere,V. (1997). The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol. Cell Biol.* 17, 5400-5409.
- Smale,S.T. (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1351, 73-88.
- Smale,S.T. and Kadonaga,J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 449-479.
- Soumano,K., Desbiens,S., Rabelo,R., Bakopanos,E., Camirand,A., and Silva,J.E. (2000). Glucocorticoids inhibit the transcriptional response of the uncoupling protein-1 gene to adrenergic stimulation in a brown adipose cell line. *Mol. Cell Endocrinol.* 165, 7-15.
- St Pierre,J., Lin,J., Krauss,S., Tarr,P.T., Yang,R., Newgard,C.B., and Spiegelman,B.M. (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 278, 26597-26603.
- Sugioka,R., Shimizu,S., and Tsujimoto,Y. (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.* ...
- Suske,G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238, 291-300.
- Szabadkai,G., Simoni,A.M., Chami,M., Wieckowski,M.R., Youle,R.J., and Rizzuto,R. (2004). Drp-1-Dependent Division of the Mitochondrial Network Blocks Intraorganellar Ca(2+) Waves and Protects against Ca(2+)-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* 16, 59-68.

- Tanaka,T., Yamamoto,J., Iwasaki,S., Asaba,H., Hamura,H., Ikeda,Y., Watanabe,M., Magoori,K., Ioka,R.X., Tachibana,K., Watanabe,Y., Uchiyama,Y., Sumi,K., Iguchi,H., Ito,S., Doi,T., Hamakubo,T., Naito,M., Auwerx,J., Yanagisawa,M., Kodama,T., and Sakai,J. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 15924-15929.
- Thompson,C.C., Brown,T.A., and McKnight,S.L. (1991). Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science* *253*, 762-768.
- Tiranti,V., Savoia,A., Forti,F., D'Apolito,M.F., Centra,M., Rocchi,M., and Zeviani,M. (1997). Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 615-625.
- Vanacker,J.M., Bonnelye,E., Delmarre,C., and Laudet,V. (1998). Activation of the thyroid hormone receptor alpha gene promoter by the orphan nuclear receptor ERR alpha. *Oncogene* *17*, 2429-2435.
- Vega,R.B. and Kelly,D.P. (1997). A role for estrogen-related receptor alpha in the control of mitochondrial fatty acid beta-oxidation during brown adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* *272*, 31693-31699.
- Vila,M. and Przedborski,S. (2003). Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 365-375.
- Virbasius,C.A., Virbasius,J.V., and Scarpulla,R.C. (1993a). NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev.* *7*, 2431-2445.
- Virbasius,J.V., Virbasius,C.A., and Scarpulla,R.C. (1993b). Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.* *7*, 380-392.
- Vogel,J.L. and Kristie,T.M. (2000). The novel coactivator C1 (HCF) coordinates multiprotein enhancer formation and mediates transcription activation by GABP. *EMBO J.* *19*, 683-690.
- Wallberg,A.E., Yamamura,S., Malik,S., Spiegelman,B.M., and Roeder,R.G. (2003). Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha. *Mol. Cell* *12*, 1137-1149.
- Wan,B. and Moreadith,R.W. (1995). Structural characterization and regulatory element analysis of the heart isoform of cytochrome c oxidase VIa. *J. Biol. Chem.* *270*, 26433-26440.
- Wang,X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* *15*, 2922-2933.
- Wang,Y.X., Lee,C.H., Tjep,S., Yu,R.T., Ham,J., Kang,H., and Evans,R.M. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* *113*, 159-170.
- Wei,M.C., Zong,W.X., Cheng,E.H., Lindsten,T., Panoutsakopoulou,V., Ross,A.J., Roth,K.A., MacGregor,G.R., Thompson,C.B., and Korsmeyer,S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* *292*, 727-730.



- Williams,R.S. (1986). Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J. Biol. Chem.* **261**, 12390-12394.
- Winder,W.W., Holmes,B.F., Rubink,D.S., Jensen,E.B., Chen,M., and Holloszy,J.O. (2000). Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* **88**, 2219-2226.
- Wolzt,M., MacAllister,R.J., Davis,D., Feelisch,M., Moncada,S., Vallance,P., and Hobbs,A.J. (1999). Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin. Mechanisms underlying synthesis, no release, and biological activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 28983-28990.
- Wong,E.D., Wagner,J.A., Gorsich,S.W., McCaffery,J.M., Shaw,J.M., and 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.
- Wrutniak,C., Cassar-Malek,I., Marchal,S., Rasclé,A., Heusser,S., Keller,J.M., Flechon,J., Dauca,M., Samarut,J., and Ghysdael,J. (1995). A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J. Biol. Chem.* **270**, 16347-16354.
- Wu,H., Kanatous,S.B., Thurmond,F.A., Gallardo,T., Isotani,E., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (2002). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* **296**, 349-352.
- Wu,H., Naya,F.J., McKinsey,T.A., Mercer,B., Shelton,J.M., Chin,E.R., Simard,A.R., Michel,R.N., Bassel-Duby,R., Olson,E.N., and Williams,R.S. (2000). MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J.* **19**, 1963-1973.
- Wu,H., Rothermel,B., Kanatous,S., Rosenberg,P., Naya,F.J., Shelton,J.M., Hutcheson,K.A., DiMaio,J.M., Olson,E.N., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (2001). Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J.* **20**, 6414-6423.
- Wu,Z., Puigserver,P., Andersson,U., Zhang,C., Adelmant,G., Mootha,V., Troy,A., Cinti,S., Lowell,B., Scarpulla,R.C., and Spiegelman,B.M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124.
- Xia,Y., Buja,L.M., and McMillin,J.B. (1998). Activation of the cytochrome c gene by electrical stimulation in neonatal rat cardiac myocytes. Role of NRF-1 and c-Jun. *J. Biol. Chem.* **273**, 12593-12598.
- Xia,Y., Buja,L.M., Scarpulla,R.C., and McMillin,J.B. (1997). Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 11399-11404.
- Yoon,J.C., Puigserver,P., Chen,G., Donovan,J., Wu,Z., Rhee,J., Adelmant,G., Stafford,J., Kahn,C.R., Granner,D.K., Newgard,C.B., and Spiegelman,B.M. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131-138.
- Yoon,J.C., Xu,G., Deeney,J.T., Yang,S.N., Rhee,J., Puigserver,P., Levens,A.R., Yang,R., Zhang,C.Y., Lowell,B.B., Berggren,P.O., Newgard,C.B., Bonner-Weir,S., Weir,G., and Spiegelman,B.M. (2003). Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. *Dev. Cell* **5**, 73-83.

Zakrzewska,K.E., Cusin,I., Stricker-Krongrad,A., Boss,O., Ricquier,D., Jeanrenaud,B., and Rohner-Jeanrenaud,F. (1999). Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes* 48, 365-370.

Zamzami,N., Marchetti,P., Castedo,M., Decaudin,D., Macho,A., Hirsch,T., Susin,S.A., Petit,P.X., Mignotte,B., and Kroemer,G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182, 367-377.

Zong,H., Ren,J.M., Young,L.H., Pypaert,M., Mu,J., Birnbaum,M.J., and Shulman,G.I. (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15983-15987.

Zuchner,S., Mersiyanova,I.V., Muglia,M., Bissar-Tadmouri,N., Rochelle,J., Dadali,E.L., Zappia,M., Nelis,E., Patitucci,A., Senderek,J., Parman,Y., Evgrafov,O., Jonghe,P.D., Takahashi,Y., Tsuji,S., Pericak-Vance,M.A., Quattrone,A., Battaloglu,E., Polyakov,A.V., Timmerman,V., Schroder,J.M., Vance,J.M., and Battaloglu,E. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 36, 449-451.

## Plásmidos utilizados.

1. **pGL3 Promoter Vector:** Vector comercial de Promega, que incluye el gen reportero luciferasa bajo el promotor SV40. Tiene una región para clonar *enhancers*. El promotor basal de SV40 puede extraerse fácilmente por restricción enzimática y clonar en su lugar un promotor basal de interés (ver más abajo).
2. **pGL3-basal:** Plásmido anterior al que se le ha eliminado el promotor basal de SV40. Se utiliza como control de actividad basal en experimentos de transfección transitoria.
3. **pGEM-T easy:** Vector comercial de Promega. Permite clonar productos de PCR de un modo muy sencillo puesto que es un vector no circularizado que incorpora dos colas 5' con una T, a la cual se ligan los productos de PCR a los que la polimerasa les ha añadido una A terminal en los extremos 5'.
4. **pRL-CMV (Luciferasa Renilla):** Vector de expresión de la luciferasa Renilla bajo el control de la región *enhancer*-promotora de CMV, que proporciona una expresión fuerte y constitutiva en la mayor parte de tipos celulares. (Proporcionado por Promega).
5. **-1982/+45-Luc (M):** Plásmido que contiene el fragmento de -1982 a +45 del promotor de Mfn2 humano, clonado en el vector pGL3 entre SmaI y SacI. El fragmento del promotor proviene de amplificación por PCR. Para eliminar el promotor SV40 del pGL3 se cortó con SmaI y HindII, se trató con la Klenow y se religó.
6. **-1332/+45-Luc (KpnI):** Delección a 5' del plásmido -1982/+45-Luc producida digiriendo con KpnI y religando.
7. **-682/+45-Luc (PmlI):** Delección a 5' del plásmido -1982/+45-Luc producida digiriendo con PmlI y religando.
8. **-54/+45-Luc (BssHII):** Delección a 5' del plásmido -1982/+45-Luc producida digiriendo con Asp718 y BssHII, se trató con la Klenow y se religó.
9. **-532/+45-Luc (BstEII):** Delección a 5' del plásmido -1982/+45-Luc producida digiriendo con Asp718 y BstEII, se trató con la Klenow y se religó.

## Apéndice

10. **-229/+45-Luc (BstX):** Delección a 5' del plásmido -1982/+45-Luc producida digiriendo con Asp718 y BstXI, se trató con la T4 polinucleótido quinasa y se religó.
11. **-532/+45Δ(-229/-54)Luc (Bste delec):** Al plásmido -532/+45-Luc se le eliminó la región comprendida entre -229/+54 digiriendo con BstXI y BssHIII, se trató con la T4 polinucleótido quinasa y se religó.
12. **-346/+1545-Luc:** Plásmido que contiene el fragmento de -229 a +1545 del promotor de Mfn2 humano, clonado en el vector pGL3 entre SmaI y HindIII (mantiene diana HindII). El fragmento del promotor proviene de amplificación por PCR.
13. **-346/+348-Luc:** Delección a 3' del plásmido -229/+1545-Luc digiriendo con ApaI y NcoI, tratando con la T4 polinucleótido quinasa y religando. y a continuación delección a 5' digiriendo con BstXI y Asp718, tratando con la T4 polinucleótido quinasa y religando.
14. **-229/+348-Luc (BI-BstX):** Delección a 5' de -346/+348-Luc por digestión con BstXI y Asp718, tratando con la T4 polinucleótido quinasa y religando.
15. **-54/+348-Luc (BI-BssH):** Delección a 5' de -346/+348-Luc por digestión con BssHIII y Asp718, tratando con la T4 polinucleótido quinasa y religando.
16. **+45/+348-Luc (BI-Sma):** Delección a 5' de -346/+348-Luc por digestión con SmaI y SacI, tratando con la T4 polinucleótido quinasa y religando.
17. **+84/+348-Luc (BI-Eco):** En la construcción -54/+348-Luc se ha generado una diana para EcoRI por mutagénesis dirigida en la posición +84. Se ha digerido con EcoRI y Asp718, tratado con la Klenow y religado.
18. **+123/+348-Luc (BI-Mlu):** En la construcción -54/+348-Luc se ha generado una diana para MluNI por mutagénesis dirigida en la posición +123. Se ha digerido con MluNI y Asp718, tratado con la Klenow y religado.
19. **-229/-54-Luc (BstX-pGL3):** Al plásmido -229/+45-Luc se le eliminó la región comprendida entre -54/+45 digiriendo con SmaI y NcoI. Se trató con la Klenow y se religó.

20. **-1982/+45Δ(-532/-229)Luc (2n):** Al plásmido -1982/+45-Luc se le eliminó la región comprendida entre -532/-229 digiriendo con BstXI y BstEII, se trató con la T4 polinucleótido quinasa y se religó.
21. **-1982/+45Δ(-532/-352)Luc (nBstE):** Al plásmido -1982/+45-Luc se le eliminó la región comprendida entre -532/-352 digiriendo con BstEII y AvrII, se trató con la Klenow y se religó.
22. **1982/+45Δ(-352/-229)Luc (nAvr):** Al plásmido -1982/+45-Luc se le eliminó la región comprendida entre -352/-229 digiriendo con BstXI y AvrII, se trató con la T4 polinucleótido quinasa y se religó.
23. **TK-Luc:** Este es un vector de expresión del gen luciferasa dirigido por un promotor mínimo del gen HSV timidina quinasa (TK) entre las posiciones -105 y +50, que confiere una actividad transcripcional basal notable al gen reportero luciferasa. Se construyó insertando la secuencia del promotor de la TK digerido con BglII y BamHI en el plásmido pGL3 digerido con BglII. El promotor del SV40 del pGL3 se eliminó por digestión con HindII y BglII.
24. **-532/-229-TK-Luc (2TK):** La región del promotor humano de Mfn2 comprendida entre -532/-229 se insertó en el plásmido TK-Luc entre SmaI y KpnI.
25. **-532/-352-TK-Luc (BstE-TK):** La región del promotor humano de Mfn2 comprendida entre -532/-229 se insertó en el plásmido TK-Luc entre SmaI y KpnI (se pierden las dianas).
26. **-352/-229-TK-Luc (Avr-TK):** La construcción -532/-229-TK-Luc fue digerida con Asp718 y AvrII para eliminar el fragmento -532/-352, se trató con la Klenow y se religó.
27. **-532/-459-TK-Luc (AN-TK):** La región del promotor humano de Mfn2 comprendida entre -532/-459 se insertó en el plásmido TK-Luc entre SmaI y KpnI.
28. **-459/-352-TK-Luc (AX-TK):** La región del promotor humano de Mfn2 comprendida entre -459/-352 se insertó en el plásmido TK-Luc entre SmaI y XhoI.
29. **-432/-352-TK-Luc (Pvu-TK):** En la construcción -459/-352-Luc se ha generado una diana para PvuI por mutagénesis dirigida en la posición -432. Se ha digerido con PvuI y Asp718, tratado con la Klenow y religado.

## Apéndice

30. **-407/-352-TK-Luc (Nde-TK):** En la construcción -459/-352-Luc se ha generado una diana para NdeI por mutagénesis dirigida en la Posición -407. Se ha digerido con PvuI y Asp718, tratado con la Klenow y religado.
31. **Versiones mutantes de -459/-352-TK-Luc:** Mediante mutagénesis dirigido se generaron 3 construcciones de -459/-352-TK-Luc con mutaciones en los HRE 1, 2 y 3 (MutC-TK, MutA-TK y MutB-TK). Los oligonucleótidos utilizados para realizar las mutaciones fueron:
- Mut HRE 1: 5'- tgctgctcttctGtcGAcaaaggcgactgaagg-3'
- Mut HRE 2: 5'- gctcttcttctcctcaTaTgcgactgaagggcag-3'
- Mut HRE 3: 5'- tcaaaggcgactgaaTTCcagcaggcccatgctc-3'
32. **Versiones mutantes de -1982/+45-Luc:** Se mutaron los HRE 1, 2 y 3 mediante mutagénesis dirigido utilizando los mismos oligonucleótidos que se describen arriba (MmutC, MmutA y MmutB). Se mutaron las 2 posibles cajas de unión a MEF2 (Mmut1 y Mmut2) mediante mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos representados en la Figura 33.
33. **-1332/-682-TK-Luc (Kpn-Msc-TK):** La región del promotor humano de Mfn2 comprendida entre -459/-352 se insertó en el plásmido TK-Luc entre SmaI y Asp718.
34. **-1030/-682-TK-Luc (AspA-TK):** El plásmido -1332/-682-TK-Luc se digirió con AspI y Asp718, se trató con la Klenow y se religó.
35. **-862/-682-TK-Luc(Msc-TK):** El plásmido -1332/-682-TK-Luc se digirió con MscI y KpnI, se trató con la Klenow y se religó.
36. **-1030/-862-TK-Luc (AspM-TK):** El plásmido -1030/-682-TK-Luc se digirió con MscI y MlnI, se trato con Klenow y se religó.
37. **Versiones mutantes de -1332/-682-TK-Luc:** Mediante mutagénesis dirigida se mutaron las dos posibles cajas de unión a MEF2A del plásmido -1332/-682-TK-Luc. Los oligonucleótidos usados en la mutagénesis se describen en la figura 33.
38. **Vector GFP:** Vector de expresión de la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*), utilizado como referencia de la eficiencia de transfección. Cedido por el Dr. Joan Bertrán (Dep. de Bioquímica, UB).

39. **Vector expresión PPAR $\gamma$** : Vector de expresión eucariota del factor PPAR $\gamma$  humano. Cedido por el Dr. Diego Haro (Dep. Bioquímica UB).
40. **MEF2A**: Vector de expresión del factor de transcripción miogénico MEF2A. Fue obtenido de la Dra. Pilar Ruiz-Lozano (Department of Medicine, University of California at San Diego, USA).
41. **MEF2C**: Vector de expresión, en este caso de la isoforma C de MEF2. Fue obtenido del Dr. John McDermott (Department of Biology, York University, Toronto, Canada). El cDNA de MEF2C está clonado en el vector de expresión eucariota pMT2.
42. **MEF2D**: Este vector de expresión eucariótico contiene el cDNA de MEF2D de ratón clonado entre las dianas EcoRI y HindIII del plásmido pcDNA I/A, y nos fue proporcionado por el Dr. Eric N. Olson (MD Anderson Cancer Center, The University of Texas, USA) (Martin et al., 1994).
43. **TR $\alpha$ 1-pMT2**: Este es el vector de expresión utilizado para TR $\alpha$ 1. El cDNA del receptor de hormona tiroidea  $\alpha$ 1 está clonado en la diana EcoRI de pMT2 y fue proporcionado por el Dr. Nadal-Ginard (Lee et al., 1997).
44. **pBluescript 2 KS-**: Plásmido utilizado como *carrier* en experimentos de transfección transitoria (Stratagene).
45. **MyoD**: Vector de expresión de este factor miogénico. Este plásmido llamado pEMCII(S) contiene el cDNA de MyoD de ratón, clonado en la diana EcoRI del vector de expresión EMSVscribe- $\alpha$ 2, y nos fue proporcionado por el Dr. Harold Weintraub (Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA).
46. **NFAT1**: Vector de expresión de la forma humana de NFAT1 (NFATp clonado en el plásmido pEF-BOS. Donado por el Dr. Redondo (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid)
47. **NFAT2**: Vector de expresión de NFAT2 (NFATc) humano. Cedido por el Dr. GR Crabtree (Howard Hughes Medical Institute, Stanford, USA)
48. **NFAT4**: Vector de expresión de NFAT4 clonado entre XhoI y NotI en el plásmido pREP4. Donado por el Dr. Redondo (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid)

## Apéndice

49. **NRF-1:** cDNA de NRF-1 clonado en el vector de expresión eucariótico pSG5. Proporcionado por el Dr. Richard C. Scarpulla (Northwestern University Medical School, Chicago, USA; (Virbasius et al., 1993b)
50. **PGC-1 $\alpha$ :** Vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  cedido por el Dr. Puigserver (John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA).
51. **Flag-PGC-1 $\alpha$ :** Vector de expresión de PGC-1 $\alpha$  con un epitopo Flag. Clonado en pCDNA3.1. Cedido por el Dr. Pere Puigserver (John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA)
52. **ERR $\alpha$ :** cDNA de ERR $\alpha$  clonado en la diana SmaI del vector de expresión pCMX. Cedido por el Dr. Diego Haro (Dep. Bioquímica UB).
53. **HNF-4 $\alpha$ :** Vector de expresión del HNF-4 $\alpha$  de ratón clonado en pLEN4S. Cedido por el Dr. Diego Haro
54. **COUP-TFII:** Vector de expresión del receptor nuclear COUP-TFII. Cedido por el Dr. Diego Haro
55. **Sp1:** Vector de expresión de la forma humana de Sp1 bajo el promotor del CMV. Amablemente donado por el Dr. Tjien (Universidad de California, USA).
56. **Sp3:** Vector de expresión de Sp3. Cedido por el Dr. Horowitz.
57. **c-Jun:** Vector de expresión de c-Jun. Cedido por el Dr. Chambard (Centre Antoine Lacassagne-CNRS, Niza).
58. **c-Fos:** Vector de expresión de la proteína c-Fos de ratón. Cedido por el Dr. Chambard (Centre Antoine Lacassagne-CNRS, Niza).
59. **C/EBP $\alpha$ :** cDNA de C/EBP $\alpha$  en el vector de expresión pEMBL19. Obtenido del Dr. Zhaodancao (Carnegie Institution of Washington, Baltimore).
60. **ROR $\alpha$ 2:** cDNA correspondiente a la isoforma ROR $\alpha$ 2 clonado en pCMX. Cedido por el Dr. Diego Haro.



## **Abstrat.**

Mitofusin 2 (Mfn2) is a mitochondrial fusion protein. Mfn2 have been related in several diseases such as neuropathy of Charcot-Marie-Tooth type 2A, vascular proliferative disorders and type 2 diabetes and obesity. Consequently, the mechanisms that regulate *Mfn2* gene expression are of relevance.

The human *Mfn2* promoter was cloned, showing it is located in a CpG island and lacks TATA box. That makes *Mfn2* promoter susceptible to be regulated by methylation. In skeletal muscle transcription is initiated in at least 6 points in a 171 bp window. Sp1 may direct the basal machinery to form a preinitiation complex in human *Mfn2* promoter.

*Mfn2* is highly expressed in tissues with elevated energy demand. Gene reporter assays allowed to identify some transcription factors that may mediate tissue specific expression.

*Mfn2* was induced with cold and  $\beta$ -3-adrenergic receptor agonist exposure, conditions associated with enhanced energy expenditure. The cold induced coactivator PGC-1 $\alpha$  regulated *Mfn2* expression requiring the integrity of an estrogen-related receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ )-binding element located at -413/-408. ERR $\alpha$  also activated the transcriptional activity of the *Mfn2* promoter and the effects were synergic with those of PGC-1 $\alpha$ . Repression of Mfn2 reduces oxygen consumption, glucose oxidation and mitochondrial membrane potential. Using *knock down* strategy was showed that Mfn2 could play a crucial role in mitochondrial energization by PGC-1 $\alpha$ .

Mfn2 showed higher expression in slow twitch oxidative muscle fibres than in fast twitch glucolytic fibres. This is a new evidence of Mfn2 as regulator of substrate oxidation. We proved that *Mfn2* gene expression was regulated by calcium. High intracellular calcium

levels in oxidative muscle fibres could be the initiator of the cascade that results in higher *Mfn2* expression. One of the downstream effectors of calcium is MEF2 that binds and activates *Mfn2* promoter.

Data provided indicated that *Mfn2* expression was increased in skeletal muscle when energy demand is high. The increases in *Mfn2* expression supposed a higher mitochondrial membrane potential, this mitochondrial membrane potential could be dissipated coupled to ATP synthesis (oxidative muscle) or uncoupled to produce heat (cold exposure) depending the energetic requirements of the cell in each case.