

Programa de Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona i
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Paper de les proteïnes de fusió mitocondrial Opa1 i Mfn1 durant la diferenciació miogènica

Memòria per optar al grau de Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Presentada per Eduard Noguera Jordà

Desembre 2013

El Director:

La Tutora:

El Doctorand:

Dr. Antonio Zorzano Olarte Dra. Assumpció Bosch i Merino Eduard Noguera Jordà

*“A pessimist sees difficulty
in every opportunity;
An optimist sees the opportunity
in every difficulty”*

Winston Churchill

AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull agrair i dedicar aquesta tesi als meus pares! Sense ells, no seria res!!! Sempre m'ho heu donat tot i m'ho heu posat tot molt fàcil per arribar a on estic ara mateix. Mil gràcies! Només espero que algun dia, quan tingui fills, els hi pugui transmetre tot el que m'heu donat, encara que no serà pas fàcil...

Tata!!! Tu també ets una part molt important! Mil gràcies per compartir tants anys amb mi i per haver viscut mil experiències. El teu riure és únic! I m'ho he passat genial al teu costat ;) No canviïs en aquest sentit! Ah! Tenim un tema pendent a la Illa de Pasqua... :P

Flea!!! Persona clau en la meua vida! Aquesta tesi es mig teua i també te la mereixes. Sempre em recolzaves en cada pas que feia! Em vas fer créixer moltíssim com a persona i vaig aprendre molts valors al teu costat! I era el més feliç del món, d'això no hi ha cap mena de dubte!!! Estic segur que sense tu, tampoc hauria arribat fins aquí... Ets un exemple de voluntat i que si un vol aconseguir quelcom, ho aconseguirà! Mil gràcies! *“Raise your hands and sing it with me (...)* Mitochooon-driaaa (...)*”* _bollo

Dr i Licens! Mil gràcies per tot també! Sempre m'ajudàveu en tot i em tractàveu com un més de la família. Com un rei, vaja!

Antonio! Sense tu tampoc estaria aquí. Mil gràcies per donar-me la oportunitat de fer la tesi en el teu laboratori i de viure la millor experiència de la meua vida a l'estranger. He après un munt! Sempre tenies el despatx obert per mi, per a qualsevol dubte, i això no ho fa tothom. I com a persona, un 10, no hi ha dubte!

No vull oblidar el meu passat al CBATEG... Així que...

Assumpció! Gràcies per donar-me la oportunitat de fer les pràctiques de la carrera i del màster al teu laboratori! Vaig passar una etapa fantàstica allà i vaig aprendre els primers passos en ciència. Per aquest motiu, em fa una il·lusió especial que siguis la meva tutora de la tesi. Miguel, gracias por tu sabiduria y tus grandes ideas en los labmeetings. Y las historias por los pasillos con Dan...
Mercè! Where is Coco? Hahaha Ets molt gran!

looooouuuu! Shooooow meeeee theeeee moneyyyyy!!! Quin any vaig passar amb tu durant el màster! Érem, som i serem el "terror" de la tercera! I de Medicina! I això no acabarà... Touching down everywhere! I un amic com cal ;) Marta! Mil gràcies també per recolzar-me en els meus pitjors moments. Sempre t'estaré molt agraït! Seràs una psicòloga genial ^_^ Tenim un partit de tennis pendent (amb tu també lou). I una esqujada a Andorra ;)

Lorena! Gràcies per ser la primera en ensenyar-me a fer de tot (en ciència xD). Cloning sobretot! Mai deixis d'ajudar als nous estudiants ;)

Jose i Sus! La parella perfecte! I josete! Gràcies pels consells i per les llargues converses sobre el Barça ;)

Maria vodka! "No per estar a règim, deixaré de mirar el menú" Brutal! Mai perdis l'humor. Gemma, igual! Em deus una carrera pujant les escales de medicina, tot i que és evident que perdràs. Però no et preocupis, seguiràs sent una màquina de l'atletisme! Ah... Visca el "Calibrator" :P

Anna! Mai perdis el somriure... Perquè m'encanta! Quan et veig somriure em dones un bon rollo brutal... Aviat acabaràs tu també ;) Ànims! Txell, mai perdis la simpatia que tant et caracteritza ;) Marta, també vam començar junts i acabarem aviat! És temps de disfrutar-ho :P

A la resta de Cbateguins, gràcies per compartir farres i barbacoes a ca la Lorena! Jo crec que sou de les noies que he conegut amb més ritme! M'encanta ballar amb vosaltres ;) Ho hem passat genial i això hauria de continuar ^_^

El PUTO JUANK! Què t'haig de dir que no sàpigues? Tothom hauria de tenir almenys un amic com tu. Has estat importantíssim per mi i ho saps!!! Mai hauries d'haver marxat del lab! Van cometre un gran error! Hem viscut mil experiències junts per tot arreu. No les explicaré perquè podria fer una altra tesi parlant d'això, i ja n'he tingut prou amb una... xD

I (l) Don Francis! Tacata brooooooooo!!! Kukurecu!!! Tan de bo haguéssim coincidit alhora de fer la tesi. CHULITO! Què prefereixes? Ibiza amb Carrie o Cape town acabant amb una shower of shame/glory/cash? Hahaha O comprem una pulsera a la Flo? Hahaha L'experiència de Sudàfrica va ser... Bufff! Escandalós! Mil gràcies per tot! Boris! You are great man! And Aaron! Thank U for sharing a nice trip! Also for Andile & Hlumani.

JP!!! Compatriota! El DIOS de la ciencia. El mejor Post-Doc que jamás he conocido! Eres brillante! Y te aseguro que superas a muchos PI... Pero hay algo que te hace diferente: eres, además, el más generoso! Ayudas y sin ningún tipo de interés. Digno de admirar! Aun me acuerdo cuando llegamos casi juntos... Eras el "solitario". Y mira ahora... Grandes amigos!!! Gracias por todo, de corazón!!! Por enseñarme en ciencia y de la vida.

Hoooooola Jana! Hahaha Gran persona y brillante con tus comentarios. Aunque sea un "flipao", sabes que me aprecias :P

PP, el rei dels pirates!!! Ho hem passat molt malament junts, oi? Hahaha St Petersburg va ser... Èpic! Sense tu... Potser estaria repartit per parts dins

d'altres persones xD Mil gràcies per tot! Ets un gran amic i seguirem fent de les nostres ;) “Disparé...” :P Me descojono!

Trucha! Toquero cabroooooon! Hahaha Millones de gracias por los momentos que compartimos en el lab, fuera y en Regensburg! Bua... Lo pasé brutal! Con Felix, Pia... Oktoberfest!!! Y recuerda, tu eres el rey de la montaña, pero yo “conozco el mar” ;) Recupérate pronto y vamos a por la lubina con el Kayak :P

George!!! La trompeta!!! Un crack!!! Gràcies per ajudar-nos tant i per convertir un lab que era una casa de putes a un lab prou coordinat! I tot és mèrit únicament teu! Ets meticulós i extremadament eficient! Hem rigut moltíssim, aportes un extra al lab ;)

Doc! Darling! Gràcies pels grans moments que em passat junts! I per voler ensenyar-me el conill! Hahaha Per cert, encara vols el meu múscul? :P Malpensats! És el gastrocnemi!!! Hahaha Quines “col·locades” hem pillat al lab amb el isofluorà... Bufff! I quan se’ns va escapar el ratolí a l’estabulari? OMG hahaha En fi... No canviïs mai com a persona!

Dr Duran! Tan de bo arribis a ser un polític important i eliminis la xusma que tenim... Tot pel nostre país, Catalunya! Ets un tiu com els que no hi ha! Super bona persona! No canviïs ni que arribis al poder eh! Hahaha Tenim un P&P pendent! Dr vs Dr? Qui sap ;) Ah! Tens una “jefa” preciosa! Gisela ohlala! Hahaha Quan et fa una abraçada, és com si fessis 2h de pectorals ;) Ara em diràs: gamberro... :P

Yuli Peruana! Fuiste la primera en decirme que me apuntara a los viajes de “Weekend Out”... Yo no quería y mira... Ahora soy guía turístico de vez en cuando ;) hahaha Eso sí, el favor te lo devolví en Calella de Palafrugell y lo

sabes! :P Y también compañera de un gran viaje, Jordania e Israel! Bueno, allí también te ayudé eh! xD Cual será el siguiente? Ánimos para la tesis, que no es para tanto! Y no cambies!

Helen! Fiera! Ets una esponja!!! hahaha Una de les persones més divertides i amb més vida del lab! Segueix igual!

Aiii mi Ana! Si soy Dr... Seguiré siendo casoso? Hahaha Gracias por toda la alegría que transmites y por ser tan buena persona. No cambies por nada del mundo, por favor! ;)

Gonzalo! El rey de los becarios! El faraón!!! Tu si eres un auténtico crack en todo! Y que fiestas... Eres una grandísima persona y un buen amigo! Tenemos una cuenta pendiente para Carnaval ;) Te queda poco a ti también! Let's go!

Trufita! Hahaha Gracias por tu ayuda técnica en el lab pero sobretodo, por los momentos compartidos fuera ;)

Arbuuu!!! El noi de les fotocòpies! Hahaha Visca les mares de l'AMPA! Hahaha Ho hem passat molt bé també! Algun dia hauríem de fer un remember, no? Ets un gran tiu, i dels pocs que crec que arribarà algun dia a PI. Tu segueix lluitant pel que vols, ho tens casi tot per arribar a ser-ho algun dia ;)

Latosa! Cara de niña buena y sonrisa de niña mala :P Donde están las pelusillas? En TU ordenador? :P Gracias por enseñarme en Biología Molecular, sin duda eres la mejor del lab en este campo! Y por los grandes momentos que hemos compartido en la vida cotidiana ;)

Lady Saska! The most glamorous lady in the lab ;) hahaha We have already shared nice experiences. You know we have a "Bad romance" ;) I love when you are angry... Keep on being a Real Mandril fan and you will be unhappy the rest of your life :P hahaha

Miret! Miss papirolet! Ets la noia més divertida que he conegut a la meua vida, i això diu moltíssim de tu! Gràcies pel teu gran humor, alegria i "zascas" al lab amb el David i per ser tan bona persona. Però això no s'acaba aquí eh! Ens queden moltes coses per compartir encara :P

J. Louis! Sempre que em pregunten si vull droga, els hi dic que ja tinc els teus cristalls... Hahaha Lukasz, you are so great! We have this Catalan-Poland connection! Visca el Barça i visca Catalunya! Gràcies als dos per tot (i pels partits de futbol).

Mestre!!! Un crack i una de les millors persones que conec! Gràcies pels consells i per preocupar-te per mi. Jess, també gràcies per tot!

Pauuulitaaaaa!!! Estás en la élite! Ya tenías tu grupo guay (ya sabes) y ahora el fenotipo guay :P Ojalá tengas suerte y consigas una buena tesis ;)

Sebas! Vaya crack de los comentarios verdes... Tengo uno de por vida en mi mente y, aunque no lo voy a escribir, estoy contigo! Hahaha Gracias por todo y por ayudar cuando es necesario ;)

Manuel, gracias por tus críticas constructivas y por nuestras conversaciones del Barça por el lab y los pasillos. Anna Gumà i Marta Camps, gràcies per tot també, i per l'alegria que teniu sempre.

Marc! Gràcies per tot el que m'has ensenyat! Sempre recordaré el primer dia que vaig arribar i em vas ensenyar a fer un "explosiu" ;)

Dra Romero! Sigue ayudando a los nuevos! Gracias por tus consejos en todo lo que te preguntaba.

Alba! No perdis mai el somriure i tan de bo et donin la oportunitat de fer la tesi. Te la mereixes i de llarg. Visca el Barça!

El "Apostol" Nacho! Tengo una frase en mi mente: "Te voy a poner mirando para Cuenca" hahaha Muy grande!

Bausà! Ets especial! Contagies l'alegria i ets un plus que el lab necessita! Sinó seria bastant més avorrit, la veritat. Mil gràcies per tot!

Molner! Una de les persones més eficients que conec! Tot està sota control amb tu. Gràcies per la teva alegria també.

Natali! Què faria aquest lab sense la teva gran ajuda amb els ratolins? Hahaha Gràcies per tot i pel bon rollo que transmetes.

MJ! Lovely girl! Awesome smile and sooo kind! Keep on being as you are ;)
Jeque! Vaya crack también! Un grande en ciencia y como persona. Sigue así!

Joana, ets única! "Gonzalooooo"! hahaha Manuuu! Em trobaràs a faltar? Espero que si eh! Sonia (la capi), Aran, Eleonora, Chiara, Txell, Anita Sancho Ohlala, Sus Bodoy, Sus Bial, Caroline, Paola, Laura, Vanessa. Gràcies pels vostres somriures quan ens creuàvem.

Orian! What can I say? You are not just a PI... You are friend! Thank you for accepting me to do a short-term stay at your lab, for being as a dad for me and for sharing the first PA with me! And also for cooking a “special lamb” just for me. You have the best team, no doubts about it! The atmosphere in your lab is simple awesome. I will always remember what you said: “Edu, you are strong, but fragile”. And the top quote: “If you get a unique result, you will have a Cell, but nobody will do it again”.

Kiana!!! You are great! I enjoyed a lot working with you. Thanks for helping me with all the stuff and for teaching me how to get BAT. And you are the only one who knows all the stories that happened to me in Boston. Wow! Do not change, you are so nice ;)

Alenka! Amazing scientist and a better person. You taught me a lot how to use the PA. And we spent a great time at microscope. Do you remember the “hole” on a C2C12 cell? Crazy! Thanks!!!

Kyle! Another amazing guy! Thanks for your help and for the “journals”.

Fe! The Earthquake from Brazil! Hahaha It was great to share my experiences with you. You are great and you have a nice smile ;)

Wei!!! A really nice guy! I still remember when we were in a club in Philly and you said: Edu, go to the red one! Wow dude! That girl was stunning! And she will be a Doctor soon! Hahaha Hope to see U again... Shanghái maybe?

Andrew! The only one who played a basketball match with me against Black people! Thank you for sharing this experience with me and also for helping me with everything in the lab.

Sam, you are more than a technician... You are an awesome scientist! Thanks for your help Bro!

Nathan, Laura, Charles & Linsey. Thank you for everything in Boston!

Joan Montero, Roger Davin, Carles Barceló i Mariiii! Gràcies per tot a Boston! Per les farres, per "Las Vegas", pels trekkings... Simply amazing! Tambien a ti Ivett, gracias por transmitirme mucha alegría! Tambien a ti Laurita, Marcelo, Lucía... Qué grandes!

Gràcies a la resta de la família: Yaya B, mil gracias por todo y por ser como eres, un encanto! Yaya C, quin exemple de força mental! Insuperable! També tu Teta, Mamén, Cousin, Alfonsito i els altres tiets!

També a tota la gent que ha passat per la meva vida, ni que fos un únic segon, i m'hagin arrancat un somriure. De fet, cada segon marca el següent, i així es construeix tot el futur.

Finalment, vull recordar als que ja no estan, als 3 Jaumes! Yayo B, Yayo C i al meu insuperable Padrí!!! Sempre estareu en mi! Gràcies per tot!!!

ÍNDEX

ÍNDEX

ÍNDEX	1
<u>1 Abreviatures.....</u>	9
<u>2 Introducció.....</u>	15
2.1 Mitochondria.....	15
2.1.1 Dinàmica mitocondrial	17
2.1.1.1 Fusió mitocondrial.....	18
2.1.1.2 Fissió mitocondrial	21
2.1.2 Funció mitocondrial	22
2.1.2.1 Sistema OXPHOS	24
2.1.2.2 Espècies reactives d'oxigen (ROS).....	27
2.1.3 Relació entre dinàmica i funció mitocondrial	29
2.2 Opa1	31
2.2.1 Estructura, localització, processament i funció.....	31
2.2.2 Atròfia òptica autosòmica dominant	35
2.3 Mfn1	37
2.3.1 Estructura, localització i funció	37
2.4 Diferenciació miogènica a partir de mioblasts C2C12.....	38
<u>3 Objectius.....</u>	45
<u>4 Resultats</u>	49
4.1 Opa1	49

4.1.1	Generació i validació dels adenovirus recombinants. Model utilitzat ...	49
4.1.2	Efectes de la deficiència de Opa1 sobre la morfologia i la taxa de fusió mitocondrial en cèl·lules C2C12	52
4.1.3	Efectes de la deficiència de Opa1 sobre la funció mitocondrial	57
4.1.3.1	Abundància mitocondrial	57
4.1.3.2	Expressió d'altres proteïnes implicades en la dinàmica mitocondrial	58
4.1.3.3	Potencial de membrana mitocondrial.....	60
4.1.3.4	Expressió d'algunes subunitats dels complexos de la cadena respiratòria	61
4.1.3.5	Taxa del consum d'oxigen i activitat glicolítica	63
4.1.3.6	Producció de ROS	71
4.1.4	Efectes de la deficiència de Opa1 sobre la diferenciació miogènica	76
4.1.4.1	Morfologia durant la diferenciació miogènica	76
4.1.4.2	Marcadors de diferenciació miogènica	78
4.1.4.3	Activitat transcripcional de factors clau de miogènesi	81
4.1.4.4	Senyalització entre funció mitocondrial i diferenciació miogènica deguda a la deficiència de Opa1	83
4.1.4.4.1	Inhibidors de MyoD	83
4.1.4.4.2	Reguladors de la miogènesi: p38, ERK, JNK i NF-κB.....	85
4.1.5	Efectes de l'ús d'antioxidants sobre la diferenciació miogènica afectada per la deficiència d'Opa1.....	89
4.1.6	Generació, validació i fenotip de la repressió parcial de la proteïna Opa1 en múscul esquelètic de ratolí	99
4.1.7	Generació, validació i fenotip observat de la repressió total de la proteïna Opa1 en múscul esquelètic de ratolí	101
4.2	Mfn1	107
4.2.1	Generació i validació dels adenovirus recombinants. Model utilitzat .	107

4.2.2	Efectes de la deficiència de Mfn1 sobre la morfologia i la taxa de fusió mitocondrial en cèl·lules C2C12	109
4.2.3	Efectes de la deficiència de Mfn1 sobre la funció mitocondrial	113
4.2.3.1	Abundància mitocondrial	113
4.2.3.2	Potencial de membrana mitocondrial	114
4.2.3.3	Expressió d'algunes subunitats dels complexos de la cadena respiratòria	116
4.2.3.4	Taxa del consum d'oxigen i activitat glicolítica	118
4.2.3.5	Producció de ROS	126
4.2.4	Efectes de la deficiència de Mfn1 sobre la diferenciació miogènica ...	132
4.2.4.1	Morfologia durant la diferenciació miogènica	132
4.2.4.2	Marcadors de diferenciació miogènica	134
4.2.4.3	Activitat transcripcional de factors clau de miogènesi	137
4.2.4.4	Senyalització entre funció mitocondrial i diferenciació miogènica deguda a la deficiència de Mfn1	139
4.2.4.4.1	Inhibidors de MyoD	139
4.2.4.4.2	Reguladors de la miogènesi: p38, ERK, JNK i NF- κ B	141
4.2.5	Efectes de l'ús d'antioxidants sobre la diferenciació miogènica afectada per la deficiència de Mfn1	146
4.2.6	Generació, validació i fenotip de la repressió parcial de la proteïna Mfn1 en múscul esquelètic de ratolí	152
5	<u>Discussió</u>	157

5.1	Efectes de la repressió de Opa1 i Mfn1 sobre la morfologia i funció mitocondrial	158
------------	---	------------

5.2	Efectes de la repressió de Opa1 i Mfn1 sobre la diferenciació miogènica	165
------------	--	------------

5.3	Efectes de la repressió de Opa1 i Mfn1 en múscul esquelètic.....	169
------------	---	------------

6	<u>Conclusions</u>	173
----------	---------------------------------	------------

7	<u>Materials i mètodes</u>	177
----------	---	------------

7.1	Cultius cel·lulars.....	177
------------	--------------------------------	------------

7.1.1	Línies cel·lulars	177
-------	-------------------------	-----

7.1.2	Medis de cultiu	179
-------	-----------------------	-----

7.1.3	Subcultius de manteniment	179
-------	---------------------------------	-----

7.1.4	Congelació/Descongelació de cèl·lules	181
-------	---	-----

7.1.5	Comptatge de cèl·lules.....	182
-------	-----------------------------	-----

7.1.6	Detecció de micoplasma	183
-------	------------------------------	-----

7.1.7	Transfecció de cèl·lules	184
-------	--------------------------------	-----

7.1.8	Producció i amplificació d'adenovirus recombinants	185
-------	--	-----

7.1.9	Titulació d'adenovirus recombinants.....	189
-------	--	-----

7.1.10	Transducció adenoviral en mioblasts C2C12.....	189
--------	--	-----

7.2	Tècniques de Biologia molecular, manipulació i detecció d'àcids nucleics	190
------------	---	------------

7.2.1	Vectors plasmídics: amplificació i purificació.....	190
-------	---	-----

7.2.2	Restricció i lligació de DNA.....	191
-------	-----------------------------------	-----

7.2.3	PCR	192
-------	-----------	-----

7.2.4	Clonació de miRNA.....	193
-------	------------------------	-----

7.2.5	Clonació per recombinació (<i>Gateway</i>).....	198
-------	---	-----

7.2.6	Purificació de fragments de DNA	202
-------	---------------------------------------	-----

7.2.7	Purificació de RNA total	203
-------	--------------------------------	-----

7.2.8	Síntesi de cDNA	203
-------	-----------------------	-----

7.2.9	<i>Real-Time PCR</i>	204
-------	----------------------------	-----

7.2.10	Genotipació del ratolí KO específic de múscul esquelètic per Opa1 .	211
7.3	Tècniques de manipulació i detecció de proteïnes.....	213
7.3.1	Obtenció d'extractes totals.....	213
7.3.2	Determinació de la concentració de proteïna	214
7.3.3	<i>Western Blot</i>	215
7.3.4	Immunocitoquímica	221
7.3.5	Anàlisi de la morfologia i de la dinàmica mitocondrial mitjançant proteïnes mitocondrials fluorescents	222
7.3.6	Anàlisi de la taxa de fusió mitocondrial mitjançant la mtPA-GFP.....	223
7.4	Estudis metabòlics en mioblasts C2C12.....	224
7.4.1	Experiments de respirometria	224
7.4.2	Mesura de la producció d'anions superòxid mitocondrials	228
7.4.3	Mesura dels nivells de peròxid d'hidrogen mitocondrial i dels nivells de peròxid d'hidrogen en lisats totals.....	229
7.4.4	Mesura del potencial de membrana mitocondrial	230
7.5	Anàlisi de l'activitat transcripcional mitjançant assaigs luciferasa	231
7.6	Estudis de regeneració muscular	233
7.6.1	Preparació histològica	233
7.6.2	Tinció Hematoxilina-Eosina.....	234
8	<u>Bibliografia</u>	<u>237</u>
9	<u>Annex.....</u>	<u>257</u>
9.1	Llista de miRNAs	257
9.2	Llista d'encebadors	257
9.2.1	Sybr Green.....	257
9.2.2	TaqMan	258

9.2.3	Seqüenciació	258
9.2.4	Cribatge i genotipació del ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic	258
9.3	Llista d'anticossos	259
9.4	Publicacions.....	259

ABREVIATURES

1 ABREVIATURES

Ab	Anticòs
ADOA	Atrofia òptica autosòmica dominant
ADP	Adenosina bifosfat
Amp	Ampicil·lina
ATP	Adenosina trifosfat
bp	Parell de bases
BSA	Sèrum d'Albumina Bovina
°C	Graus celcius
Cav3	Caveolina 3
CCCP	Carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona
CPE	Efecte citopàtic
cDNA	DNA complementari
CMV	Citomegalovirus
Da	Daltons
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulòxid
eMHC	Cadena pesada de la miosina embrionària
DNA	Acid Deoxiribonucleic
Drp1	<i>Dynamin related protein 1</i>
ECAR	Taxa d'acidificació del medi extracel·lular
EDTA	Àcid etilen-diamino-tetraacètic
EGTA	Àcid etilen-glicol-tetraacètic
et al.	I altres / i col·laboradors
FBS	Sèrum fetal boví
FCCP	Carbonilcianida-p-trifluorometoxifenilhidrazona
Fis-1	<i>Fission homologue 1</i>

g	Gram
GFP	Proteïna verda fluorescent
Gys	Glicogen sintasa
h	Hora
H&E	Hematoxilina-Eosina
HEPES	Àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfònic
HS	Sèrum de cavall
i-AAA	<i>i-intermembrane space oriented</i>
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Kan	Kanamicina
KO	<i>Knock-out</i>
l	Litre
I-Opa1	Isoformes grans de Opa1
M	Molar (mol/l)
M1	Mfn1
M2	Mfn2
m-AAA	<i>m-matrix of mitochondria oriented</i>
MCH	Cadena pesada de la miosina
MEFs	Fibroblasts embrionaris de ratolí
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
mg	Miligram
min	Minut
miR1	Adenovirus 1, que codifica per miRNAs
miR2	Adenovirus 2, que codifica per miRNAs
miRctrl	Adenovirus control
miRNA	microRNA

MIS	Seqüència d'import a la mitocondria
mitoHyPer	Sonda per mesurar el peròxid d'hidrogen mitocondrial
ml	Mil·lilitre
mM	Mil·limolar
mm	Mil·limetre
mRNA	RNA missatger
mtDsRed	Fluoròfor vermell que marca les mitocòndries
mtPA-GFP	Proteïna GFP fotoactivable a les mitocòndries
nDNA	DNA nuclear
O1	Opa1
OCR	Taxa de consum d'oxigen
Opa1	<i>Optic Atrophy gene 1</i>
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
R.F.U	Unitats de fluorescència relatives
Real-Time PCR	PCR en temps real
RGC	Cèl·lules ganglionars de la retina
RNA	Àcid ribonucleic
ROS	Espècies reactives d'oxigen
rox	Consum d'oxigen residual (no mitocondrial)
rpm	Revolucions per minut
s	Segon
s-Opa1	isoformes curtes de Opa1
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrilamide Electroforesis gel</i>
SP	Espectinomicina
TM	Trasmembrana
WT	<i>Wild-type</i>

μmol	Micromol
μg	Microgram
μl	Microlitre
μM	Micromolar

INTRODUCCIÓ

2 INTRODUCCIÓ

2.1 Mitocòndria

Les mitocòndries són òrgànuls de doble membrana presents en la majoria de cèl·lules eucariotes, essent la font principal d'energia per a aquestes mitjançant la respiració mitocondrial. A més, estan involucrades en altres processos, com la diferenciació cel·lular, l'homeòstasi del calci, l'apoptosi o el control del cicle cel·lular (Scheffler 2001; Rutter and Rizzuto 2000; Wang 2001). Cada una de les membranes té una composició i una funció diferent. Per una banda, la membrana mitocondrial externa (OMM) està formada aproximadament per un 50% de lípids i un 50% de proteïnes, la qual conté porines. Aquestes regulen el flux de metabòlits a través de la membrana, fent-la permeable a molècules petites de fins a 5kDa (Bay and Court 2002). Per una altra banda, la membrana mitocondrial interna (IMM) és molt menys permeable que l'externa. De fet, es compon d'un 20% de lípids i un 80% de proteïnes, fent que la majoria de molècules necessitin transportadors específics per travessar-la. A més, la seva superfície es veu augmentada per invaginacions d'aquesta, que les anomenem crestes mitocondrials (Figura 1). Les crestes són estructures molt variables, ja que depenen del tipus cel·lular i de l'estat fisiopatològic de la cèl·lula, i estan connectades a la IMM mitjançant uns segments tubulars estrets anomenats "*cristae junctions*". El 75% del citocrom c i la majoria dels complexos de la cadena de transport electrònic estan localitzades a les crestes.

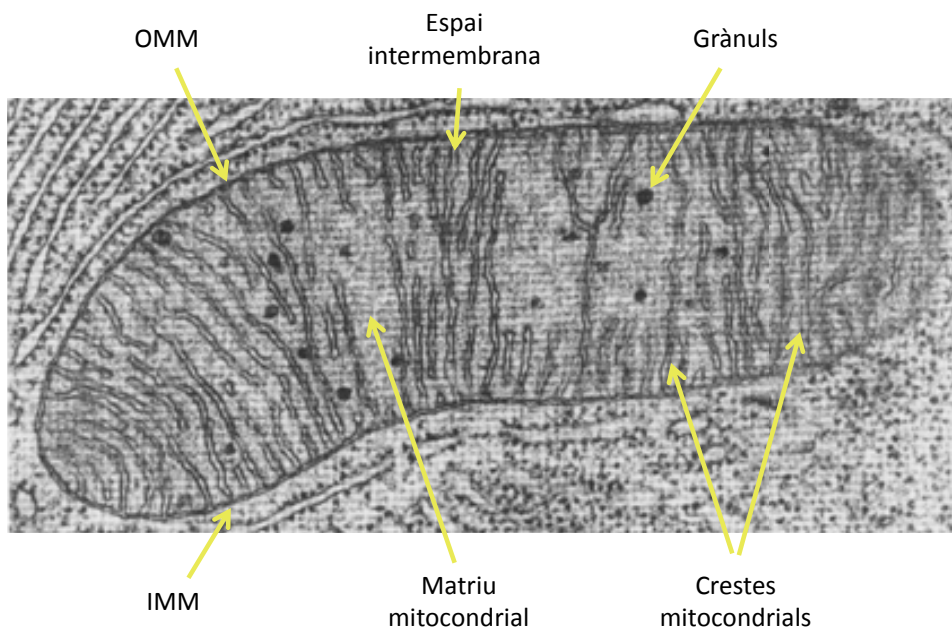


Figura 1. Ultraestructura de la mitocòndria. Imatge d'una mitocòndria obtinguda per microscopia electrònica on es poden observar els diferents compartiments. Foto extreta de la pàgina web: thinkquest.org.

La IMM envolta la matriu mitocondrial, molt rica en proteïnes. Aquí es on tenen lloc diverses rutes metabòliques, entre elles el cicle de Krebs i la β -oxidació. A més, la matriu conté el DNA mitocondrial (mtDNA), fent que les mitocòndries siguin un orgànul amb el seu propi DNA. El mtDNA consisteix en un DNA circular de doble cadena d'uns 16,5kb que codifica per 13 subunitats dels complexos de la cadena respiratòria, 2 RNAs ribosòmics i els 22 RNAs de transferència mitocondrials (Fernández-Silva, Enriquez, and Montoya 2003). Agafant en conjunt totes aquestes característiques, es recolza la teoria endosimbiòtica desenvolupada al 1971 per Margulis (Margulis 1971).

2.1.1 Dinàmica mitocondrial

La morfologia mitocondrial en cèl·lules vives és molt heterogènia i pot anar des de petites esferes fins a llargs túbuls interconnectats (Bereiter-Hahn and Vöth 1994). De fet, aquesta heterogeneïtat es coneix des de les primeres descripcions d'aquest orgànul, a mitjans del segle XIX. La denominació d'aquest orgànul com a mitocòndria no va arribar fins a finals del segle XIX, que ve dels mots grecs *mitos*, que significa fil, i *chondros*, que significa gra (Benda 1898). No va ser fins a principis del segle XX on, amb els avenços en microscòpia de camp clar i cultius cel·lulars, es va observar la primera evidència que la mitocòndria era un orgànul que patia canvis de morfologia, segurament deguts a la seva naturalesa dinàmica (Lewis and Lewis 1914). Ja a mitjans del segle XX, es va descobrir que el cicle de Krebs, la β -oxidació i la fosforilació oxidativa tenien lloc dins d'aquest orgànul (Lehninger 1965). Aquestes troballes, juntament amb la publicació de les primeres imatges d'alta resolució de mitocòndries mitjançant microscòpia electrònica i el descobriment del DNA mitocondrial, van afavorir el concepte de la seva funció independent i autònoma. Tot i així, durant els anys 70, diferents estudis van demostrar la complementació i recombinació del DNA mitocondrial en llevat, degut a probables fenòmens de fusió mitocondrial (Thomas and Wilkie 1968; Miyakawa et al. 1984). A més, durant aquest període també es van descriure processos de fusió mitocondrial i la formació de xarxes mitocondrials en teixits de mamífer (Kimberg and Loeb 1972; Bakeeva, Chentsov YuS, and Skulachev 1978). Als anys 90, el desenvolupament de sondes i proteïnes fluorescents dirigides a la matriu mitocondrial van permetre la visualització detallada fenòmens de fusió i fissió mitocondrial en diversos models cel·lulars '*in vivo*' (Bereiter-Hahn and Vöth 1994). No obstant, no ha estat fins als últims anys on s'ha aconseguit idear i realitzar amb èxit la tècnica del fotomarcatge d'una única o d'un grup de

mitocòndries dins d'una cèl·lula viva per fotoconversió de la proteïna mtPA-GFP, essent la única que permet visualitzar *'in vivo'* les interaccions d'aquestes mitocòndries amb altres mitjançant la dilució de la GFP (és a dir, la fusió mitocondrial) i la monitorització del seu moviment al llarg de la xarxa mitocondrial (Twig et al. 2006; Molina and Shirihai 2009; Lovy et al. 2012).

Ha estat àmpliament descrit que canvis en el balanç de fusió i fissió mitocondrial dona lloc a alteracions en la forma mitocondrial. De fet, quan ambdós processos s'inhibeixen, la morfologia mitocondrial és similar a la que s'observa en estat basal, demostrant que la forma és conseqüència del balanç entre aquests dos processos (H. Chen et al. 2003). No obstant, encara que la morfologia mitocondrial és un bon indicador del balanç entre la fusió i la fissió mitocondrial, no és un paràmetre definitiu per concloure que hi ha més o menys fusió/fissió. D'aquesta manera, la morfologia mitocondrial no només depèn dels components de la dinàmica mitocondrial sinó que també depèn d'altres proteïnes o mediadors, com per exemple les proteïnes del citoesquelet (Anesti and Scorrano 2006).

2.1.1.1 Fusió mitocondrial

La fusió mitocondrial és un procés de dos passos, on la membrana externa i la interna es fusionen de manera coordinada però separada (Malka et al. 2005), i depèn del potencial de membrana mitocondrial i de la hidròlisi de GTP (Legros et al. 2002; Meeusen, McCaffery, and Nunnari 2004). Tot i això, les diferents maquinàries proteiques s'han detectat en el mateix complex, suggerint la coregulació d'ambdós passos (Guillery et al. 2008).

Les proteïnes identificades fins al moment que participen directament en el procés de fusió mitocondrial en mamífers són 3: la Mitofusina 1 (Mfn 1), la

Mitofusina 2 (Mfn2) i Opa1 (*Optic Atrophy gene 1*) (Figura 2). Totes elles, estan relacionades amb la dinamina i presenten activitat GTPasa. Per una banda, les mitofusines es troben anclades a la OMM. En canvi, Opa1 es pot trobar ancorada a la IMM (concretament, les isoformes llargues de Opa1 (l-Opa1)) o de manera soluble a l'espai intermembrana (les isoformes curtes de Opa1 (s-Opa1)) (Song et al. 2007; Guillery et al. 2008).

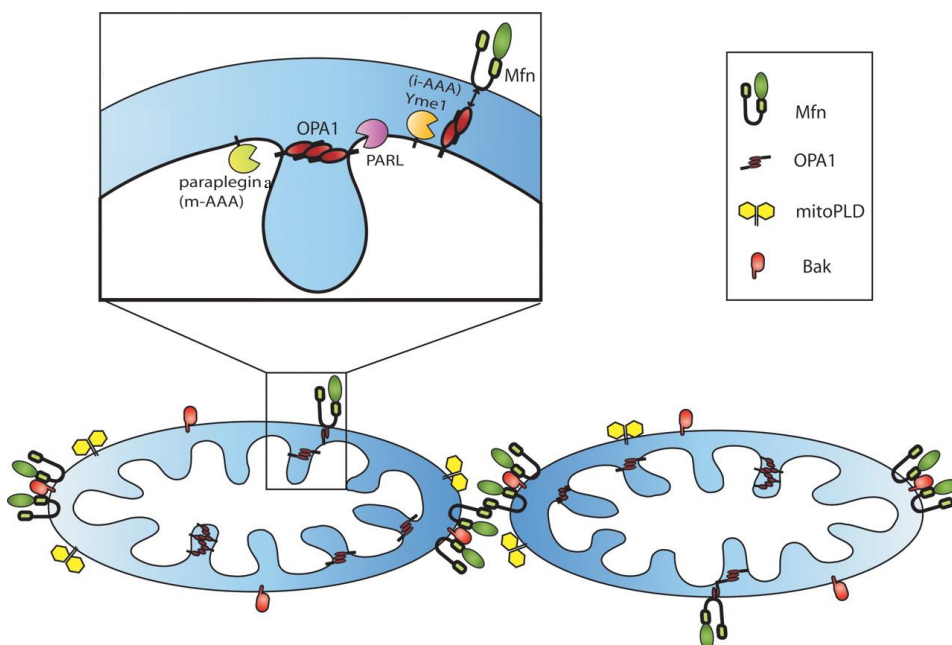


Figura 2. Maquinària de fusió mitocondrial. Esquema de la localització submitocondrial de les proteïnes clau involucrades en la fusió mitocondrial de cèl·lules sanes de mamífer: Mfn1, Mfn2 i Opa1. També es mostren Bak i mitoPLD, que són proteïnes moduladores de la fusió mitocondrial. El "zoom in" mostra la localització d'algunes de les proteases que estan involucrades en el processament de Opa1. Esquema adaptat de l'article de Suen, Norris, and Youle 2008.

Tant la Mfn1 com la Mfn2 van ser identificades a la vegada com a homòlegs en mamífer de la Fzo (*Drosophila Fuzzy onions protein*), la primera que es va descobrir que mediava la fusió mitocondrial (Hales and Fuller 1997). Per a dur a terme la fusió, és necessari que dues mitofusines en mitocòndries adjacents

formin un dímer homotípic (Mfn1-Mfn1) o heterotípic (Mfn1-Mfn2) (H. Chen et al. 2003; Koshiba et al. 2004). Tant la Mfn1 com Mfn2 s'expressen de manera ubiqua, tot i que els seus nivells d'expressió difereixen segons el teixit. Així doncs, Mfn1 predomina en pàncreas, fetge, testicles i glàndules adrenals i la Mfn2 en múscul esquelètic, cor, teixit adipós marró i cervell (Bach et al. 2003; H. Chen et al. 2003). Estudis en ratolins *knock-out* per a qualsevol de les dues mitofusines mostren la mort d'aquests durant el desenvolupament embrionari (H. Chen et al. 2003). En cèl·lules, l'absència de qualsevol de les dues mitofusines mostren uns nivells molt reduïts de la fusió mitocondrial (H. Chen et al. 2003); (H. Chen, Chomyn, and Chan 2005). En canvi, en absència de les dues, la fusió mitocondrial observada és nul·la, resultant en una pèrdua total dels túbuls mitocondrials i en una funció mitocondrial defectuosa (H. Chen et al. 2003; H. Chen, Chomyn, and Chan 2005).

Opa1 va ser identificada al 2000 per dos grups independents (C Delettre et al. 2000; Alexander et al. 2000) com a la proteïna homòloga en mamífers de Mgm1, proteïna descrita prèviament en *S. Cerevisiae* (B. A. Jones and Fangman 1992). A diferència de la Mfn1 i la Mfn2, Opa1 està implicada en la fusió de la IMM i en el control de la morfologia de les crestes mitocondrials (Cipolat et al. 2004). Opa1 s'expressa a tots els teixits, amb una major expressió a múscul esquelètic, retina, cervell, cor, testicles, fetge i pàncreas (Alexander et al. 2000; C Delettre et al. 2000). A més, presenta una regulació post-transcripcional i post-traduccional molt complexa (Ishihara et al. 2006). De la mateixa manera que amb Mfn1 i Mfn2, estudis en ratolins amb mutacions per a Opa1, també presenten letalitat embrionària (V. J. Davies et al. 2007; Alavi et al. 2007). Pel que fa a estudis cel·lulars i de manera similar a Mfn1 i Mfn2, l'absència de Opa1 fa que s'observin uns nivells molt reduïts de la fusió mitocondrial (H. Chen et al. 2003).

2.1.1.2 Fissió mitocondrial

Les proteïnes més rellevants identificades fins al moment que estan implicades en la fissió mitocondrial són tres: Drp1 (*Dynamain-related protein 1*), Fis1 (*Fission 1 homologue protein*) i Mff (*Mitochondrial fission factor*) (Figura 3). Drp1 és una GTPasa soluble que es localitza al citosol i que s'expressa a tots els teixits (Smirnova et al. 1998). Per tant, per tal de mediar la fissió, necessita unir-se a una proteïna ancorada a la OMM. Inicialment, es pensava que aquesta proteïna era únicament Fis1 (Yoon et al. 2003). Fis1 és una proteïna molt petita, d'expressió ubiqua, ancorada a la OMM i que no presenta activitat GTPasa. No obstant, estudis posteriors en dinàmica mitocondrial postulen que la Mff és una altra proteïna també ancorada a la OMM, que s'uneix a Drp1 i que promou la fissió mitocondrial, de manera independent a Fis1 (Gandre-Babbe and van der Blik 2008; Otera et al. 2010). A més, s'ha demostrat que les proteïnes adaptadores MiD49 i MiD51, ancorades també a la OMM, recluten Drp1 i medien la fissió mitocondrial en absència de Fis1 i Mff (Palmer et al. 2011; Palmer et al. 2013; Losón et al. 2013).

A part d'aquestes proteïnes, s'han descrit altres proteïnes involucrades en la fissió mitocondrial (també ancorades a la OMM), tot i que encara es desconeixen els mecanismes d'acció. Així doncs tenim la GDAP1 (Niemann et al. 2005), l'endofilina B1 (Karbowski, Jeong, and Youle 2004), la MTP18 (Tondera et al. 2005) i la ubiquïtina lligasa MULAN (W. Li et al. 2008). Recentment, s'ha descrit que la INF2 (*Inverted formin 2*) actuaria *upstream* de Drp1, induint la polimerització de l'actina provocant la constricció inicial de la mitocòndria (Korobova, Ramabhadran, and Higgs 2013).

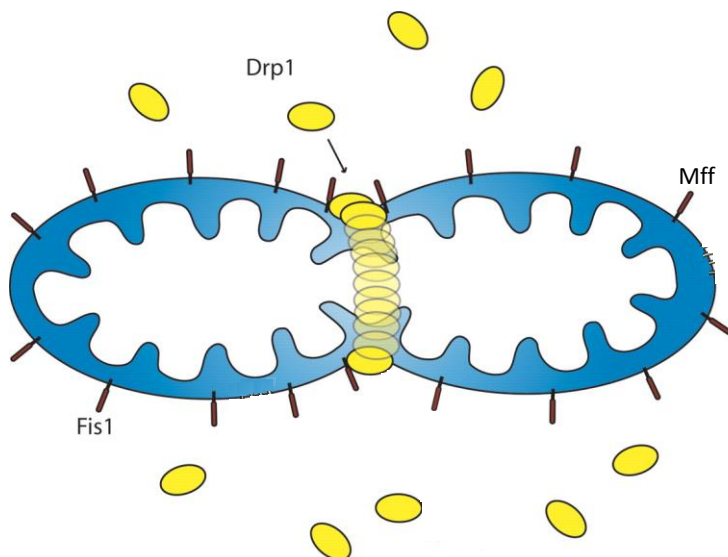


Figura 3. Maquinària de fissió mitocondrial. Esquema de la localització de les proteïnes clau involucrades en la fissió mitocondrial de cèl·lules sanes de mamífer: Drp1, Fis1 i Mff. Esquema adaptat de l'article de Suen, Norris, and Youle 2008.

Estudis en ratolins *knock-out* per a Drp1 mostren letalitat durant el desenvolupament embrionari (Ishihara et al. 2009; Wakabayashi et al. 2009). En cèl·lules, una reducció en l'expressió de Drp1 (Smirnova et al. 2001), la sobreexpressió d'una forma dominant negativa de Drp1 (Frank et al. 2001) o la reducció en l'expressió de Fis1 (Lee et al. 2004), causa un increment en la fusió mitocondrial, observant filaments mitocondrials llargs i interconnectats.

2.1.2 Funció mitocondrial

Les mitocòndries són el centre del metabolisme energètic cel·lular, essent la principal font d'ATP per les cèl·lules eucariotes. De fet, només un 5% de l'ATP generat per la glucosa prové de la glicòlisi. Així doncs, els 3 processos mitocondrials que generen ATP són:

1. El cicle de l'àcid tricarboxílic, localitzat a la matriu mitocondrial, on es produeixen els cofactors reduïts NADH i FADH₂. Aquests es generen degut a l'oxidació de l'Acetil-CoA, que alhora prové de l'oxidació de diferents substrats, com del piruvat procedent de la glicòlisi, àcids grassos (β -oxidació) o aminoàcids.
2. La cadena de transport d'electrons, on els electrons provinents de l'oxidació del NADH i FADH₂ passen a través d'una sèrie de complexos enzimàtics localitzats a la IMM i es transfereixen finalment a l'oxigen. Per limitar la dissipació d'energia lliure, els electrons es transfereixen dels complexos amb més potencial redox cap als de menys. El complex I (NADH deshidrogenasa) catalitza la transferència d'electrons del NADH al coenzim Q (coQ). El complex II (Succinat deshidrogenasa) transfereix directament els electrons del succinat al coQ. Seguidament, el complex III (Citocrom c reductasa) transfereix els electrons del coQ al citocrom c, on a la vegada els trasllada al complex IV (Citocrom c oxidasa). Finalment, el complex IV catalitza la transferència d'electrons del citocrom c a l'oxigen. La transferència d'electrons en els complexos I, III i IV està acoblada al bombeig de protons de la matriu a l'espai intermembrana.
3. El sistema de fosforilació, que utilitza el gradient electroquímic de protons generat anteriorment perquè el complex V (ATP sintetasa) catalitzi la síntesi d'ATP a partir de ADP i Pi. Així doncs, el consum d'oxigen per part de la cadena respiratòria està acoblat a la síntesi d'ATP. No obstant, els protons bombejats a l'espai intermembranós poden tornar a entrar a la matriu mitocondrial per vies alternatives a l'ATP sintetasa, procés conegut com a *proton leak* (Brand 1990). En aquest cas, el consum d'oxigen (activitat de la cadena respiratòria) no està acoblat a la síntesi d'ATP. Aquest *proton leak* es dona per difusió

facilitada dels protons a través de la IMM o bé a través de les proteïnes desacoblants UCPs i provoca un desaprofitament energètic del gradient electroquímic de protons (Brand et al. 1994).

Ajuntant la cadena de transport d'electrons i la producció d'ATP mitjançant el sistema de fosforilació, tenim el que s'anomena fosforilació oxidativa (sistema OXPHOS) (Figura 4)

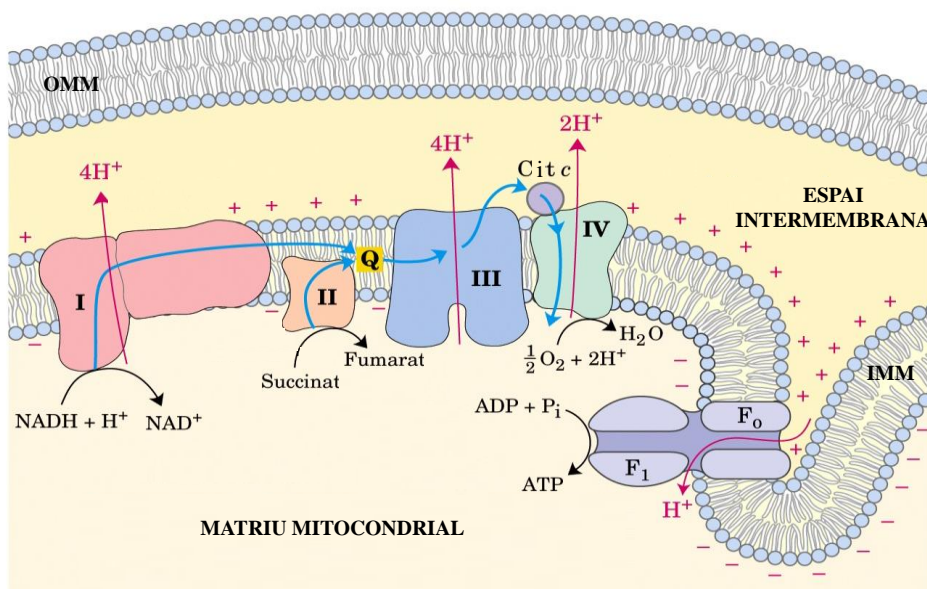


Figura 4. Esquema del sistema OXPHOS. El pas d'electrons a través dels complexos de la cadena respiratòria genera un gradient electroquímic de protons que serà utilitzat per l'ATP sintetasa per generar ATP. Q: ubiquinona; Cit c: citocrom c.

2.1.2.1 Sistema OXPHOS

El complex I està considerat el "punt d'entrada" dels electrons a la cadena respiratòria. Catalitza la transferència d'electrons del NADH a la ubiquinona utilitzant un cofactor (FMN), 8 grups redox i un grup ferro-sofre. És el complex més gran, format per 45 subunitats, de les quals 7 estan codificades pel DNA

mitocondrial (Brandt 1997). A més, per microscòpia electrònica s'ha vist que té forma de "L" (Sazanov et al. 2000).

El complex II està format per 4 subunitats, totes elles codificades pel DNA nuclear, 3 grups ferro-sofre, una molècula FAD i un grup citocrom b. Té dos funcions: durant el cicle de Krebs transforma el succinat a fumarat i durant la cadena de transport d'electrons transfereix electrons del FADH₂ a la ubiquinona. Està format per dos parts: una soluble que està constituïda per les unitats catalítiques de l'enzim i una ancorada a la membrana. Aquí, la transferència d'electrons no està acoblada a la translocació de protons a través de la membrana (Hägerhäll 1997).

El complex III de la cadena respiratòria catalitza la transferència d'electrons de l'ubiquinol al citocrom c acoblant aquesta reacció amb el bombeig de 4 protons des de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana (Saraste 1999). Es tracta d'un complex dimèric, on cada monòmer està format per 11 subunitats, diversos grups redox i un dímer de Fe₂S₂. Només la subunitat citocrom b està codificada pel mtDNA.

El complex IV és l'últim complex de la cadena de transport d'electrons. Catalitza la oxidació del citocrom c donant els electrons a l'oxigen per generar aigua. Aquesta reacció està acoblada al bombeig de dos protons. Aquest complex està format per 13 subunitats, de les quals 3 estan codificades pel mtDNA: COXI, que té els grups hemo; COXII, important per l'enllaç amb el citocrom c; COXIII, important pel bombeig de protons (Tsukihara et al. 1996).

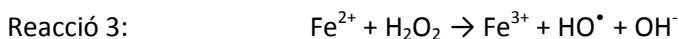
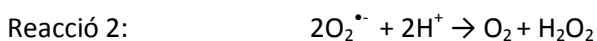
El complex V catalitza la síntesi de l'ATP a partir del ADP + P_i utilitzant l'energia del gradient de protons electroquímico generat per la cadena de transport d'electrons. El complex està format per 16 subunitats que formen dos dominis

funcionals: F_0 i F_1 (Futai, Noumi, and Maeda 1989). La regió F_0 és integral a la membrana i actua com a porus de protons, transferint-los a la F_1 per un moviment rotatori. En canvi, la regió F_1 està localitzada a la matriu mitocondrial i està formada per 5 subunitats i conté el domini catalític de la proteïna (Stock, Leslie, and Walker 1999). Quan el potencial de membrana disminueix, l'ATP sintetasa pot hidrolitzar l'ATP a ADP (funcionant com a ATPasa). Aquest canvi funcional el controla la subunitat IF1 (Cabezón et al. 2003).

Tot i que els complexos s'han purificat individualment en una forma enzimàticament activa (Hackenbrock, Chazotte, and Gupte 1986), hi ha evidències que aquests s'organitzen en estructures supramoleculares estables anomenades supercomplexes (Schägger and Pfeiffer 2000). De fet, amb això es va passar del model "estat fluid", on els complexos difonen lliurement per la IMM, al model "estat sòlid", on la formació de supercomplexes estables facilitaria un transport d'electrons més ràpid i eficient (Lenaz and Genova 2007). No obstant, no va ser fins fa poc on s'ha postulat el model "integrat", on coexistirien complexos i supercomplexes, i la presència d'uns o altres dependria de l'estat fisiològic de la cèl·lula (Dudkina et al. 2008; Acín-Pérez et al. 2008). Des d'aleshores, s'han visualitzat supercomplexes directament en crestes mitocondrials intactes per tomografia electrònica (K. M. Davies et al. 2011) i factors que per una banda ajuden a la formació del complex III i IV, també afavoreixen la formació de supercomplexes (Y.-C. Chen et al. 2012). Finalment, s'ha descrit que Opa1 contribueix a la formació dels supercomplexes, on la relació de formació d'aquests supercomplexes és fins a 8 cops menor en fibroblasts deficients per Opa1 (Cogliati et al. 2013).

2.1.2.2 Espècies reactives d'oxigen (ROS)

El terme ROS generalment engloba qualsevol molècula que conté oxigen (radical o no radical) capaç d'iniciar algun tipus de reacció perjudicial. No obstant, participen en funcions essencials, com en la senyalització redox i en la eliminació de bacteries mitjançant neutròfils i macròfags (Dröge 2002). La principal font de ROS és la cadena de transport d'electrons de la mitocòndria, que produeix anions superòxid (reacció 1), peròxid d'hidrogen (reacció 2) i radicals hidroxil (reacció 3):



La generació d'anions superòxid té lloc per la pèrdua d'electrons en els complexos I, II i III, que redueixen parcialment l'oxigen molecular (Figura 4). Aquests, es converteixen ràpidament en peròxid d'hidrogen mitjançant l'enzim superòxid dismutasa. A partir d'aquí, el peròxid d'hidrogen és convertit en aigua per acció de la catalasa o la glutatió peroxidasa.

Tot i aquests mecanismes de defensa, el control dels nivells de ROS no és perfecte, ja que depèn de l'estat energètic mitocondrial. Així doncs, una sobreproducció o una deficient eliminació de ROS dona lloc a estrès oxidatiu, que està associat al dany oxidatiu del DNA, proteïnes i lípids. Per exemple, un augment en el potencial de membrana o la inhibició dels complexos de la cadena de transport d'electrons dona lloc a un increment dels nivells de ROS (Korshunov, Skulachev, and Starkov 1997; Melov et al. 1998). A més, tant un excés com una limitació dels nivells de ROS podrien alterar les vies de

senyalització redox, que donarien lloc a una expressió gènica alterada i a una disfunció cel·lular. De fet, hi ha una forta evidència que ROS està directament involucrat en el desenvolupament de malalties, tals com el càncer, la diabetis, el Parkinson o l'Alzheimer (Halliwell 2012).

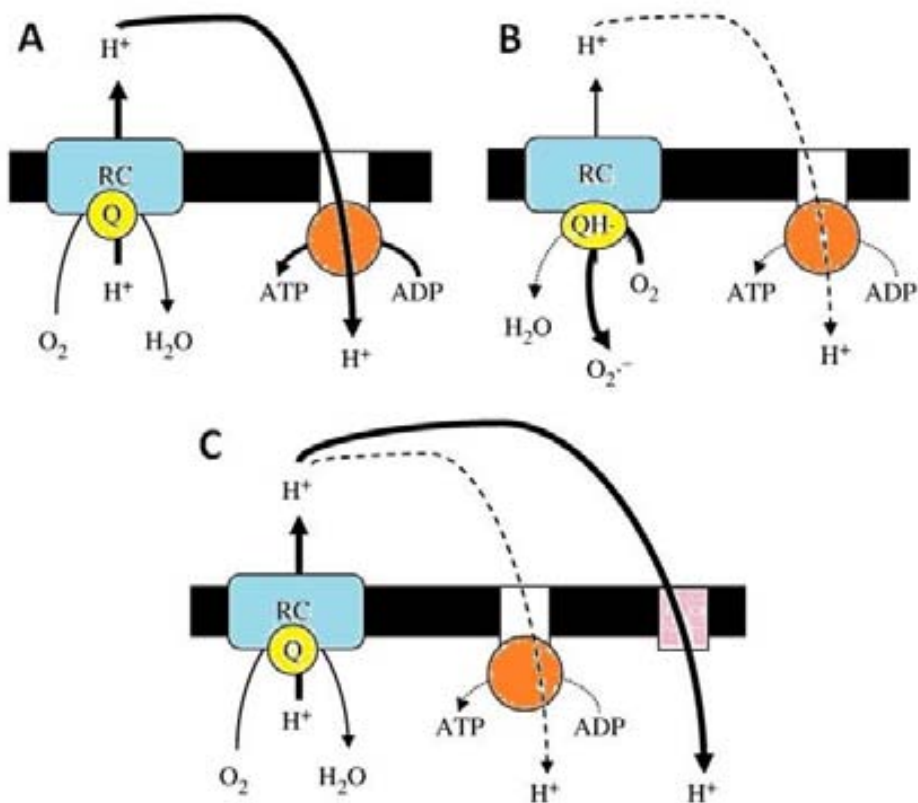


Figura 5. Regulació de la producció de ROS mitjançant la cadena respiratòria. (A) Quan la respiració està acoblada a la producció d'ATP, els electrons passen fàcilment a través de la cadena respiratòria i reaccionen amb l'acceptor final, l'oxigen, per produir aigua. (B) Quan la producció d'ATP es redueix, el flux d'electrons s'alenteix i els coenzims reduïts com la ubisemiquinona (QH₂) poden reaccionar directament amb l'oxigen produint anions superòxid. (C) La obertura d'una segona porta a través de la IMM induïx un lleuger desacoblament i permet als protons tornar a la matriu mitocondrial, augmentant la respiració i recuperant la vida mitja dels coenzims reduïts, a la vegada que es disminueix el risc de formació d'anions superòxid. Esquema adaptat de l'article de Criscuolo and Boullaud, 2009.

2.1.3 Relació entre dinàmica i funció mitocondrial

Les mitocòndries pateixen cicles de fusió i fissió per tal de modular la seva morfologia, distribució i funció segons les necessitats de la cèl·lula. En primer lloc, la fusió i la fissió controlen la forma, la llargada i el número de mitocòndries (H. Chen et al. 2003). Així doncs, el balanç entre aquests dos processos controla la morfologia mitocondrial. En segon lloc, la fusió i la fissió mitocondrial permet a les mitocòndries intercanviar membranes lipídiques i el contingut intramitocondrial. Aquest intercanvi deu ser clau per mantenir la població mitocondrial sana. De fet, quan una mitocòndria està danyada, perd el seu potencial de membrana, alhora que perd la capacitat per fusionar amb altres mitocòndries sanes. El següent pas seria la disminució dels nivells de Opa1, seguits per la eliminació de la mitocòndria per autofàgia (Twig, Hyde, and Shirihai 2008). Finalment, la forma de les mitocòndries afecta a la capacitat de les cèl·lules per distribuir les mitocòndries a localitzacions subcel·lulars específiques, com les dendrites (Z. Li et al. 2004).

Alteracions tan en les proteïnes de fusió com de fissió mitocondrial produeixen alteracions en el metabolisme mitocondrial. Estudis en MEFs deficients per Mfn1 o Mfn2, presenten una respiració basal normal i acoblada, tot i que ja presenten un potencial de membrana disminuït (H. Chen et al. 2003). En canvi, MEFs deficients en Mfn1 i Mfn2 (doble mutant) o en Opa1 presenten un creixement més lent, una gran heterogeneïtat pel que fa al potencial de membrana mitocondrial, una disminució de la respiració basal i una incapacitat de respondre al desacoblant 2,4-dinitrofenol (H. Chen, Chomyn, and Chan 2005). Pel que fa a les proteïnes involucrades en la fissió mitocondrial, tenim un fenotip similar. Així doncs, la repressió de Drp1 en cèl·lules HeLa causa una disminució en la respiració basal i una menor taxa de síntesi d'ATP (Benard et al. 2007). De la mateixa manera, la utilització d'un dominant negatiu per Drp1

(K38A) o la repressió de Fis1 en cèl·lules INS1 també redueixen la respiració mitocondrial (Twig et al. 2008).

A part de tenir un rol en el metabolisme mitocondrial, la modulació de la dinàmica mitocondrial també està involucrada en altres processos, com en la regulació de l'apoptosi (Cereghetti and Scorrano 2006) o de la senyalització del calci (Rizzuto, Bernardi, and Pozzan 2000). Opa1, com s'ha comentat anteriorment, jugar un paper clau en el manteniment de la morfologia de les crestes mitocondrials. Com a conseqüència, la seva repressió provoca una desorganització en les crestes que es tradueix en una alliberació de citocrom c, activant l'apoptosi (Arnoult et al. 2005). No obstant, no és la única proteïna de dinàmica mitocondrial involucrada en aquest procés, ja que tan la repressió de Drp1 com de Fis1 produeixen resistència a l'apoptosi. Es més, la sobreexpressió de Fis1 estimula l'apoptosi (Lee et al. 2004). A més, s'ha observat la situació contrària, on la proteïna proapoptòtica Bak de la família Bcl-2 interactua amb Mfn1 i Mfn2 i controla la morfologia mitocondrial (Brooks et al. 2007). De fet, cèl·lules que en són deficientes presenten una fragmentació mitocondrial molt marcada degut a una reducció en la fusió (Karbowski et al. 2006).

Per una banda, hi ha diverses malalties neurodegeneratives, com el Parkinson, l'Alzheimer o el Huntington que presenten alteracions tant en la dinàmica com en la funció mitocondrial (H. Chen and Chan 2009). Per una altra, també s'ha demostrat que en obesitat i diabetis tipus 2 hi ha alteracions tant en la dinàmica com en la funció mitocondrial, on existeix una correlació negativa entre l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic i l'índex de massa corporal i una correlació positiva entre l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic i la sensibilitat a la insulina (Bach et al. 2003; Bach et al. 2005; Hernández-Alvarez et al. 2010). A més, hi ha dos malalties, l'atròfia òptica autosòmica i la Charcot-Marie-Tooth tipus 2A, causades per mutacions en els gens de Opa1 i Mfn2,

respectivament (C Delettre et al. 2000; Alexander et al. 2000; Züchner et al. 2004).

2.2 Opa1

2.2.1 Estructura, localització, processament i funció

El gen humà de OPA1 està format per 30 exons codificants distribuïts al llarg de més de 90kb de DNA genòmic al cromosoma 3q28-q29, i s'expressa de manera ubiqua, tot i que la major expressió recau en múscul, cor, retina, cervell i testicles (Alexander et al. 2000; C Delettre et al. 2000).

La proteïna Opa1 es pot trobar ancorada a la IMM (tot i que també s'ha trobat a la OMM) o de manera soluble a l'espai intermembrana. Està formada per una seqüència d'import a la mitocòndria (MIS), un domini transmembrana (TM), un domini GTPasa, un *middle domain* i dos dominis *coiled-coil* (CC). La MIS és N-Terminal i té 87aa, sent hidrolitzada per la proteasa MPP (*Mitochondrial processing peptidase*) un cop Opa1 ja ha estat importada a la mitocòndria (Akepati et al. 2008). Per una altra banda, el TM és el que ancora Opa1 a la IMM (Ishihara et al. 2006). El domini GTPasa es clau per la seva activitat, ja que mutacions en aquest domini donen lloc a una morfologia mitocondrial fragmentada. El primer CC (CC1) està localitzat després del TM i està involucrat en la interacció proteïna-proteïna. Finalment, el segon CC (CC2) és C-Terminal i és el domini efector de la GTPasa (GED), involucrat en la oligomerització i activació de les dinamines (Figura 6)

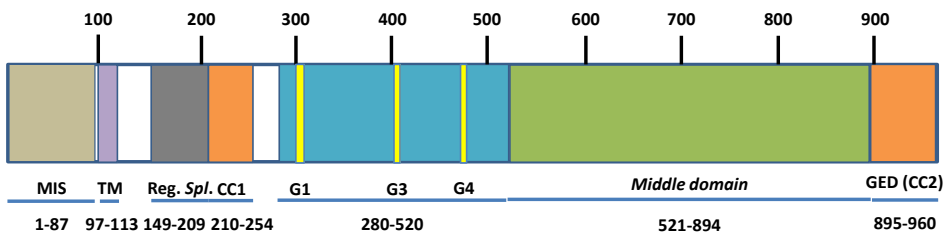


Figura 6. Mapa a escala de la seqüència aminoacídica de la isoforma 1 humana d'OPA1. En marró es marca la seqüència d'import a la mitocondria (MIS), que es hidrolitzada posteriorment per la proteasa MPP. En violeta es mostra el domini transmembrana (TM) que ancora Opa1 a la IMM, amb la part C-Terminal orientada a l'espai intermembrana. En gris se senyala la regió variable segons les variants d'*splicing* alternatiu. En taronja es marquen els dos dominis coiled coil (CC1 i CC2). A diferència de les mitofusines, Opa1 presenta una major similitud amb les dinamines, ja que presenta un *Middle domain* (en verd) característic de les dinamines i que es requereix per la seva tetramerització i la formació d'estructures més complexes. Finalment, en blau es mostra el domini GTPasa amb les tres caixes mínimes (en groc) necessàries per la hidròlisi del GTP.

Opa1 té una regulació post-transcripcional molt complexa. En humans, l'*splicing* alternatiu dels exons 4, 4b i 5b dona lloc a 8 isoformes de mRNA que s'expressen de manera ubiqua (C Delettre et al. 2001) (Figura 7). En canvi, en ratolins només n'hi ha 4, formades a partir de l'*splicing* alternatiu dels exons 4b i 5b (Akepati et al. 2008).

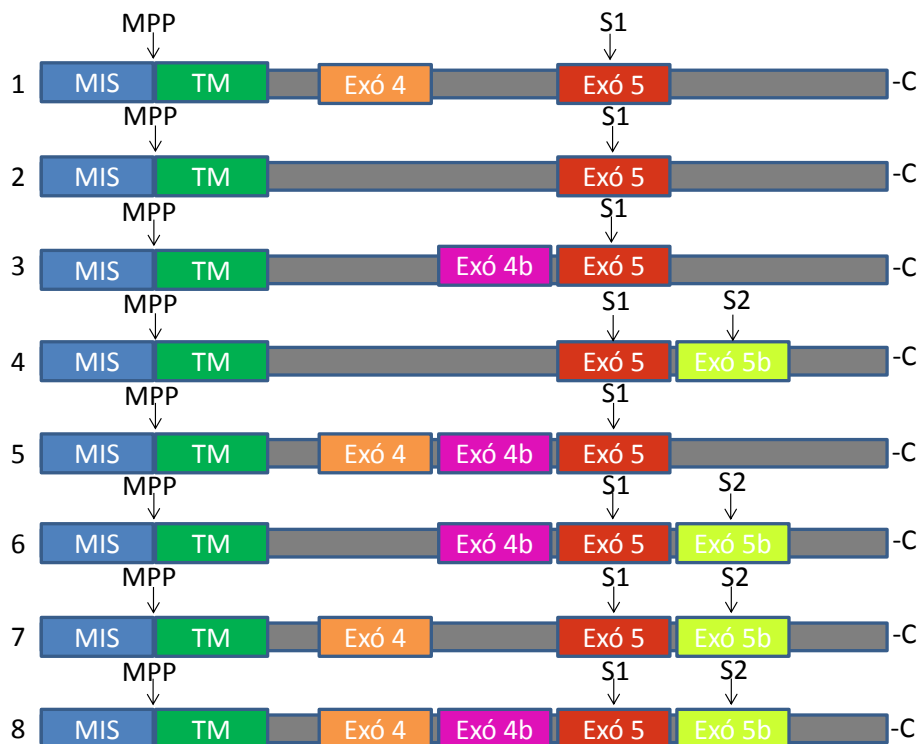


Figura 7. Representació esquemàtica de les 8 isoformes humanes d'mRNA de Opa1 generades per *splicing alternatiu*. Els diferents mRNAs generats per *splicing alternatiu* difereixen en la presència o absència dels exons 4, 4b i 5b. El processament de la MIS mitjançant la MPP dona lloc a les isoformes llargues de Opa1 (l-Opa1). La proteòlisi posterior en les posicions S1 o S2 genera les diferents isoformes curtes de Opa1 (s-Opa1).

A més, també està regulada per proteòlisi, que augmenta la quantitat de isoformes curtes. Així doncs, mitjançant l'anàlisi per *Western Blot*, tan en ratolins com en humans, es detecten 5 bandes ben diferenciades entre 80 i 100kDa. En humans, les dos bandes que mostren un pes molecular més alt (l-Opa1) corresponen a una barreja de la traducció de les isoformes 1, 2, 4 i 7 i les tres bandes amb un menor pes molecular (s-Opa1) corresponen a una barreja de la traducció de les isoformes 3, 5, 6 i 8 (curiosament, totes elles contenen l'exó 4b) conjuntament amb els productes de la proteòlisi de les l-Opa1 (Song

et al. 2007). A més, les l-Opa1 tenen la capacitat de recuperar la deficiència de fusió en cèl·lules KO per Opa1, mentre que les s-Opa1 no. No obstant, les l-Opa1 necessiten les s-Opa1 per mediar la fusió mitocondrial (Song et al. 2007; DeVay et al. 2009). En canvi, en ratolí només s'han detectat dues isoformes en les dues bandes de major pes molecular (la 1 i la 7) i es creu que les tres bandes de menor pes són producte de la hidròlisi d'aquestes dues isoformes (Akepati et al. 2008). A més, tant la inducció de la apoptosi com la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial indueix la hidròlisi de Opa1 i la conseqüent fragmentació de la xarxa mitocondrial (Duvezin-Caubet et al. 2006).

Les tres proteases de mamífers identificades fins al moment que hidrolitzen Opa1 són les proteases m-AAA (complexes homo- o heteromèrics que contenen la paraplegina, Afg3l1 i/o Afg3l2), la proteasa i-AAA Yme1L i PARL (*Preselenin-associated rhomboid-like protease*).

En quan a la proteasa m-AAA, inicialment es pensava que la paraplegina estava involucrada tant en el processament de Opa1 com en la conseqüent fragmentació mitocondrial (Ishihara et al. 2006). No obstant, s'ha demostrat que per si sola no es una reguladora del processament de Opa1, ja que la seva absència no afecta a aquest processament (Duvezin-Caubet et al. 2007). En canvi, dos subunitats de m-AAA, Afg3L1 i Afg3L2, si regulen aquest processament i poden formar complexos actius amb la paraplegina (Duvezin-Caubet et al. 2007). Estudis recents indiquen que la pèrdua de funció de Afg3l1 i Afg3l2 en MEFs causa l'acumulació de la s-Opa1 degut a un augment en el processament al punt S1 (Figura 7), seguida d'una fragmentació mitocondrial i de manera independent a Drp1. Posteriorment, es va identificar la proteasa involucrada en el processament i degradació de la l-Opa1 en cèl·lules: Oma1 (Ehses et al. 2009). Així doncs, la deficiència de Oma1 en cèl·lules deficientes per

Afg3L1 i Afg3L2 estabilitza la l-Opa1 i rescata la morfologia de la xarxa mitocondrial. A més, Oma1 *per se* no afecta al processament de Opa1, però s'activa per dissipació del potencial de membrana mitocondrial, pèrdua del mtDNA, deficiència en els nivells d'ATP i apoptosi (Ehses et al. 2009; Quirós et al. 2012). Per una altra banda, la proteasa i-AAA Yme1L és la responsable del processament en el punt S2 (Figura 7) en condicions basals, encara que no és l'únic punt d'acció d'aquesta proteasa. A més, es necessita una combinació de l-Opa1 i de s-Opa1 (processades per Yme1L) per a dur a terme correctament la fusió mitocondrial (Song et al. 2007; Griparic, Kanazawa, and van der Blik 2007; Guillery et al. 2008). Finalment, PARL genera una petita part de la s-Opa1 a l'espai intermembrana, controlant la morfologia de les crestes mitocondrial i, d'aquesta manera, l'alliberament de citocrom c. Així doncs, té un rol en apoptosi però no en la regulació de la morfologia mitocondrial (Cipolat et al. 2006; Frezza et al. 2006).

2.2.2 Atròfia òptica autosòmica dominant

L'atrofia òptica autosòmica dominant (ADOA) és una malaltia genètica heterogènia i 5 gens són els que estan lligats a aquesta malaltia (anomenats de OPA1 a OPA5) (Olichon et al. 2006). Entre elles, la forma més comú de ADOA és la deguda a mutacions del gen OPA1. Va ser descoberta a l'any 2000 i és la forma més comú de neuropatia òptica hereditària, amb una prevalença de 1:50000 (Alexander et al. 2000; C Delettre et al. 2000). És una malaltia específica de la retina caracteritzada per una degeneració de les cèl·lules ganglionars de la retina (RGC) seguida d'una atròfia ascendent del nervi òptic. Se sap poc de la patogènesi de l'ADOA, però la falta de dolor i inflamació durant el desenvolupament de la malaltia suggereix que l'apoptosi podria jugar un paper clau en la pèrdua de les RGC. S'han descrit més de 117 mutacions patogèniques diferents, on la majoria resulten en una proteïna truncada o bé

afecten al imprescindible domini GTPasa (Ferré et al. 2005). El fet que la malaltia es transmeti com a tret dominant, suggereix que aquestes mutacions actuarien com a dominant negatiu o induirien una condició d'haploinsuficiència fins a arribar al fenotip clínic. Està caracteritzada per una disminució de l'agudesia visual, tritanòpsia (discromatòpsia caracteritzada per la confusió de les tonalitats blaves i grogues), pèrdua de sensibilitat en els camp visual central i pal·lidesa del nervi òptic (Ferré et al. 2005). A més, l'ADOA clàssica normalment comença abans dels 10 anys d'edat, amb una gran variabilitat en la severitat de l'expressió clínic (Cécile Delettre et al. 2002).

No està clar perquè mutacions en Opa1 afecten a les RGC i no a altres tipus cel·lulars on també s'expressa de manera abundant. De fet, tampoc està clara la morfologia mitocondrial que han de tenir, ja que cèl·lules no neuronals de pacients amb ADOA poden tenir mitocòndries agregades, fragmentades o normals (C Delettre et al. 2000; Olichon et al. 2007). Per una altra banda, mutacions en Opa1 estan associades amb una reducció de la producció d'ATP i en el contingut de mtDNA (Lodi et al. 2004; Kim et al. 2005).

Recentment s'han trobat diferents mutacions (sobretot al domini GTPasa) que són responsables de l'ADOA però associada a sordesa neurosensorial, atàxia, polineuropatia axonal sensiomotora, oftalmoplegia externa progressiva i miopatia mitocondrial. A aquest fenotip clínic se l'anomena síndrome Opa1 "plus". A més, aquests pacients mostren múltiples delecions en el mtDNA al múscul esquelètic (Amati-Bonneau et al. 2008; Hudson et al. 2008; Ranieri et al. 2012; Pretegianni et al. 2011).

2.3 Mfn1

2.3.1 Estructura, localització i funció

El gen humà de Mfn1 està format per 19 exons codificants distribuïts al llarg d'uns 45kb de DNA genòmic al cromosoma 3q26.33, i s'expressa de manera ubiqüa, tot i que la major expressió recau en pàncreas, fetge, testicles i glàndules adrenals (H. Chen et al. 2003).

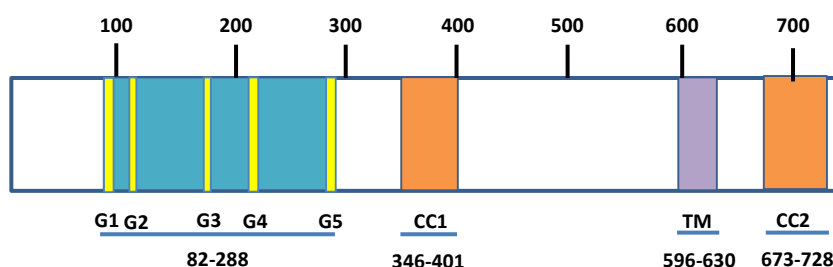


Figura 8. Mapa a escala de la seqüència aminoacídica humana de Mfn1. En blau es mostra el domini GTPasa amb les cinc caixes característiques en groc (de G1 a G3 es conforma el centre catalític i G4 i G5 confereixen la conformació pel reconeixement específic del GFP). En taronja es marquen els dos dominis coiled coil (CC1 i CC2). El CC2 està implicat en el primer pas de la fusió mitocondrial, que és la interacció entre dos Mfn de mitocondries adjacents. Finalment, en violeta es mostra el domini transmembrana (TM) que ancora Mfn1 a la OMM. Tant la part N-Terminal com la C-Terminal del domini TM estan exposades al citosol.

La proteïna Mfn1 es troba ancorada a la OMM. Està formada per un domini GTPasa, un domini transmembrana (TM) i dos dominis *coiled-coil* (CC). Mentre el domini transmembrana (TM) ancora la Mfn1 a la OMM, el CC2 és el que media el primer pas de la fusió mitocondrial, unint dues mitocondries adjacents a través d'una estructura dimèrica antiparalela CC (Koshiba et al. 2004). En el domini GTPasa, G1 uneix els fosfats del GTP, G3 coordina el magnesi que es requereix per la hidròlisi i G1, G2 i G3, conjuntament, formen el centre catalític, mentre G4 i G5 proporcionen la conformació específica per la unió específica de la GFP. L'activitat GTPasa d'aquest domini és clau per l'activitat de Mfn1, ja

que mutacions en aquest domini provoquen la pèrdua de la capacitat per fusionar mitocòndries (Santel et al. 2003; H. Chen et al. 2003).

Hi ha evidències que Mfn1 té una regulació post-transcripcional i post-traducciona, encara que no es coneixen els mecanismes moleculars que la regulen (Chung et al. 2001).

S'ha demostrat que els ratolins KO per a Mfn1 (i també per a Mfn2), són letals durant el desenvolupament embrionari. A més, fibroblasts provinents d'embrions de ratolí KO per Mfn1 mostren una caiguda en la fusió mitocondrial, que és més severa que en Mfn2 (H. Chen et al. 2003). Aquest fet es podria explicar pel simple fet que Mfn1 presenta una major activitat GTPasa. A més, altres estudis demostren que Opa1 necessita l'expressió de Mfn1 però no de Mfn2 per promoure la fusió mitocondrial en MEFs, suggerint un rol més important per Mfn1 en la fusió mitocondrial (Cipolat et al. 2004).

Tot i això, els ratolins KO condicionals per Mfn1 on únicament s'expressa a la placenta, són viables i fèrtils com a mínim 1 any. En canvi, els ratolins KO condicionals per Mfn2 mostren defectes en el moviment i en el desenvolupament cerebral, on un terç moren al dia següent de néixer i la resta als 17 dies post-natals (H. Chen, McCaffery, and Chan 2007). Aquest estudi suggereix que Mfn1 és imprescindible només en placenta, ja que els ratolins KO condicionals per Mfn1 no tenen defectes.

2.4 Diferenciació miogènica a partir de mioblasts C2C12

Els mioblasts C2C12 són una línia cel·lular que originalment van obtenir Yaffe i Saxel a través de diversos passes de mioblasts en cultiu derivats de cèl·lules satèl·lit de ratolí C3H (Yaffe and Saxel 1977). Aquests mioblasts, presenten certes característiques de la cèl·lula satèl·lit progenitora, ja que expressen Pax7,

encara que a uns nivells baixos. Pax7 és una proteïna essencial per l'autorenovació de cèl·lules satèl·lit (Kuang et al. 2006). Aquesta, juntament amb Pax3, activa gens miogènics, com MyoD, tot i que només Pax7 té una funció de supervivència i anti-apoptòtica (Relaix et al. 2006). Per una altra banda, és requisit indispensable l'expressió de MyoD i Myf5 per considerar que una cèl·lula C2C12 és un mioblast proliferatiu (Chargé and Rudnicki 2004). Per una banda, MyoD es un factor de transcripció clau perquè un mioblast mantingui el potencial per diferenciar (Sabourin et al. 1999) i per una altra, Myf5 és un factor de transcripció que regula la proliferació dels mioblasts (Ustanina et al. 2007). Ratolins deficients en MyoD tenen un múscul normal aparentment però expressen 4 cops més Myf5 (Rudnicki et al. 1992). Ratolins deficients en Myf5 també tenen un múscul normal (Braun et al. 1992). En canvi, ratolins deficients per ambdues proteïnes, tenen absència complerta de mioblasts i miofibres (Rudnicki et al. 1993).

Per a començar la diferenciació miogènica, són necessaris uns estímuls determinats, que són el contacte cèl·lula-cèl·lula i l'eliminació dels factors de creixement (Figura 9), que activen Id1, un repressor de MyoD (Benezra et al. 1990). Un cop s'activen MyoD i Myf5, s'indueix l'expressió d'uns altres factors de transcripció, que són la Miogenina i MRF4. La Miogenina regula la transició de mioblast a miotub, passant per miòcit. De fet, la Miogenina es necessària per a la correcta diferenciació miogènica i per a la formació d'una fibra madura, ja que ratolins deficients per la Miogenina presenten una absència gairebé total en la formació de miofibres i acumulen mioblasts no diferenciats (Hasty et al. 1993; Nabeshima et al. 1993). Per una altra banda, ratolins deficients per MyoD i MRF4 tenen un fenotip similar a l'observat en ratolins deficients per Miogenina, suggerint que, mioblasts que només expressen Myf5, necessiten de MRF4 per diferenciar (Rawls et al. 1998). A més, estudis en ratolins deficients

per MRF4, demostren que té un rol més tardà, ja que està més involucrat en el manteniment i creixement de la fibra adulta (Zhang, Behringer, and Olson 1995).

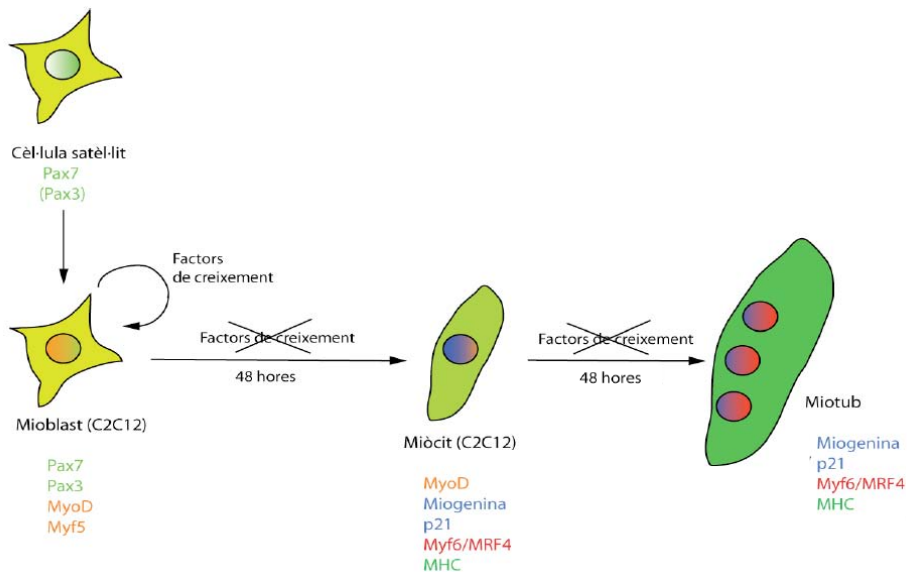


Figura 9. Esquema del procés de diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12. La cèl·lula satèl·lit expressa els factors de transcripció Pax3 i Pax7 (en verd clar) i està en estat quiescent. Aquestes cèl·lules satèl·lit donen lloc a una progènie proliferativa, que són els mioblasts, i la presència de Pax3 i Pax7 activa l'expressió de MyoD (en groc), factor de transcripció clau per la diferenciació miogènica. També s'activa l'expressió de Myf5 (en groc), important per al manteniment i proliferació dels mioblasts. Un cop es retiren els factors de creixement, Pax3, Pax7 i Myf5 es degraden i s'activa MyoD, induint l'expressió de la Miogenina (en blau) i la posterior aturada del cycle cel·lular mitjançant l'augment en la expressió de p21 (en blau). A les 48h de retirar els factors de creixement i abans que es formi el miotub, ja es pot detectar l'expressió del gen implicat en contracció i específic de múscul, la MHC (en verd), i del factor de transcripció MRF4 (en vermell). Un cop fusionen els miòcits, es formen els miotubs, en els quals hi ha una elevada expressió de MRF4, que té un paper en el manteniment de la fibra, i una caiguda en l'expressió de p21 i Miogenina. La MHC segueix augmentant els seus nivells quan es forma el miotub, el qual ja no presenta una expressió marcada de MyoD. Esquema adaptat de la tesi del Dr Marc Liesa.

Durant la diferenciació dels mioblasts C2C12, l'increment en l'expressió de la Miogenina es previ a l'increment de p21, que atura el cycle cel·lular dels mioblasts durant la diferenciació. Un cop aturat, s'indueix l'expressió de gens

específics de múscul, com la MHC, amb la consegüent generació de miòcits. Finalment, un cop formats, es fusionen per formar els miotubs, que es poden mantenir durant uns quants dies en cultiu (Figura 9).

OBJECTIUS

3 OBJECTIUS

En la tesi doctoral del Dr. Marc Liesa es va observar que existeix una modulació tant de las proteïnes de fusió mitocondrial (Mfn1, Mfn2 i Opa1) com de les de fissió (Drp1 i FIS1) durant la diferenciació miogènica. A més, la repressió de Mfn2 en mioblasts murins mostraven un important increment en els marcadors de fibres de contracció ràpida, indicant que Mfn2 podria estar actuant com a modulador de la biogènesis. Per tant, vam iniciar el projecte pensant que les proteïnes mitocondrials Opa1 i Mfn1 també podrien tenir un paper important en aquest canvi, ja que totes tres participen en el procés de fusió mitocondrial. No obstant, i veient que els resultats eren totalment contraris als esperats, es va decidir estudiar el paper d'aquestes proteïnes durant el procés de diferenciació en cèl·lules musculars C2C12.

Així doncs, ens vàrem plantejar un parell d'objectius, basant-nos en aquests resultats preliminars:

1. Estudiar el paper de la proteïna de fusió mitocondrial Opa1 durant la diferenciació muscular en cèl·lules C2C12
2. Estudiar el paper de la proteïna de fusió mitocondrial Mfn1 durant la diferenciació muscular en cèl·lules C2C12

A més, tenint en compte els resultats que s'estaven obtenint en cèl·lules i que existeix el síndrome d'Opa1 "plus" , durant la tesi es va plantejar un tercer i últim objectiu:

3. Generació i validació d'un ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic

RESULTATS

4 RESULTATS

4.1 Opa1

4.1.1 Generació i validació dels adenovirus recombinants. Model utilitzat

Per tal d'estudiar el rol de la proteïna Opa1, es va decidir modular la seva activitat mitjançant la construcció de dos vectors adenovirals amb 2 miRNAs específics contra la seqüència de Opa1 murina (anomenats miR1 Opa1 (ó miR1 O1) i miR2 Opa1 (ó miR2 O1)). De fet, es van construir aquests vectors de manera específica mitjançant la tecnologia recombinatòria de *Gateway* (Figura 1 i 2) per tal de bloquejar la seva expressió i, per tant, disminuir al màxim els seus nivells proteics. Per una altra banda i per a obtenir un vector adenoviral control (miRctrol), es van clonar també dos còpies d'un miRNA proveït per Life technologies que no reconeix cap seqüència gènica de ratolí coneguda fins al moment. Un cop obtinguts aquests vectors adenovirals, es van produir els adenovirus.

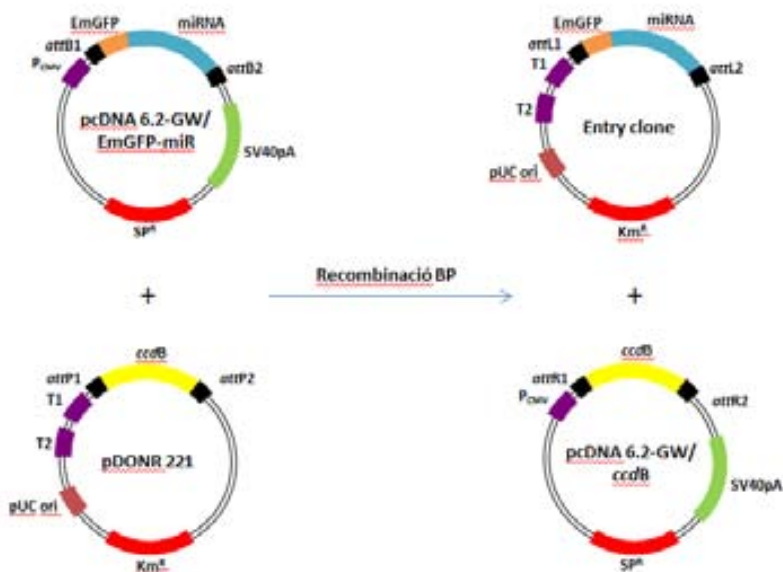


Figura 10. Recombinació BP. Exemple de la recombinació entre un plasmidi amb el gen d'interès (en aquest cas, dos miRNAs) i el vector pDONR (que confereix resistència a la Kanamicina). Un cop té lloc la recombinació, es substitueix el DNA codificant per la proteïna antibiòtica *ccdB* pel nostre gen d'interès, el qual queda flanquejat per les seqüències *attL*. Aquest plasmidi generat s'anomena *entry clone* i confereix resistència a Kanamicina.

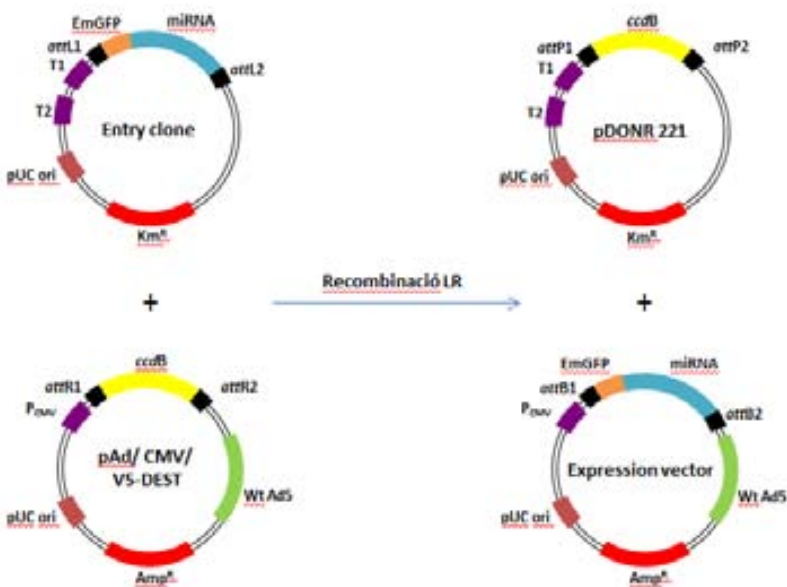


Figura 11. Recombinació LR. Un cop s'obté l'*entry clone*, aquest es recombina amb un vector de destinació que codifica per l'antibiòtic *ccdB*. A diferència del pDONR i l'*entry clone*, aquest vector confereix resistència a l'ampicil·lina, factor clau per seleccionar-lo posteriorment. Un cop realitzada aquesta segona recombinació, es genera un vector d'expressió amb el nostre gen d'interès, flanquejat per les seqüències *attB*.

Així doncs, per estudiar aquesta proteïna durant la miogènesi, es va decidir utilitzar com a model cel·lular les cèl·lules C2C12, que deriven de cèl·lules satèl·lit de múscul esquelètic de ratolí. Es van transduir mioblasts amb els adenovirus generats 48 hores abans de Dia 0 (inici del procés de diferenciació) per assegurar-nos que ja haguéssim alterat la dinàmica mitocondrial abans d'activar tota la maquinària de diferenciació cel·lular.

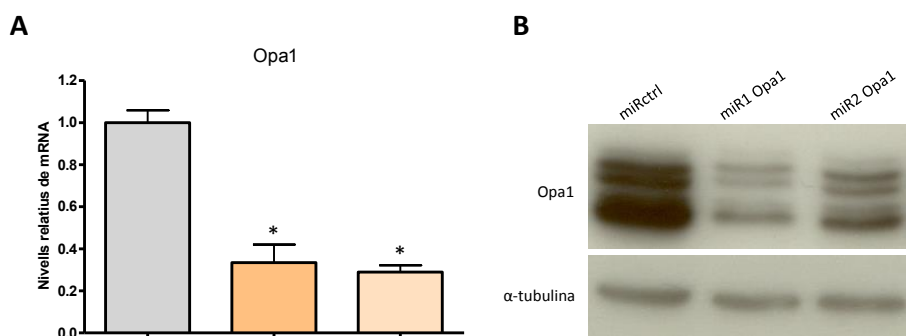


Figura 12. Determinació dels nivells de mRNA i de proteïna de Opa1 en miotubs C2C12 control i en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. (A) Anàlisi per *Real-Time PCR* dels nivells de Opa1 relativitzats a ARP (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 6 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,001$ sobre el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució. (B) Experiment representatiu de l'anàlisi per *Western Blot* dels nivells de Opa1 en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 i diferenciats fins a Dia 4.

Per tal de demostrar la validesa de la eina utilitzada, es van mesurar els nivells de RNA missatger (mRNA) i de proteïna en miotubs de Dia 4 de diferenciació

obtinguts a partir de la diferenciació de mioblasts C2C12 control o de mioblasts amb pèrdua de funció de Opa1 per *Real-Time PCR* (Figura 12A) i *Western Blot* (Figura 12B). Tant a nivell de mRNA com de proteïna es veu una reducció dels nivells d'expressió en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 pròxima al 70% respecte als miotubs C2C12 control.

4.1.2 Efectes de la deficiència de Opa1 sobre la morfologia i la taxa de fusió mitocondrial en cèl·lules C2C12

Amb la finalitat de validar si aquesta disminució en l'expressió de Opa1 afectava a la dinàmica mitocondrial, es va analitzar per microscòpia confocal la morfologia mitocondrial, obtenint diferents imatges (Figura 13) i realitzant experiments de "*time-lapse*" (veure CD adjunt) en mioblasts C2C12 mtDsRed (fluoròfor vermell que marca específicament a les mitocòndries) a Dia 0 transduïts amb els adenovirus generats. D'aquesta manera, els mioblasts C2C12 mtDsRed amb pèrdua de funció de Opa1 mostraven una fragmentació de la xarxa mitocondrial generalitzada, cosa que no es va observar en mioblasts C2C12 mtDsRed control, on predominava una xarxa mitocondrial interconnectada.

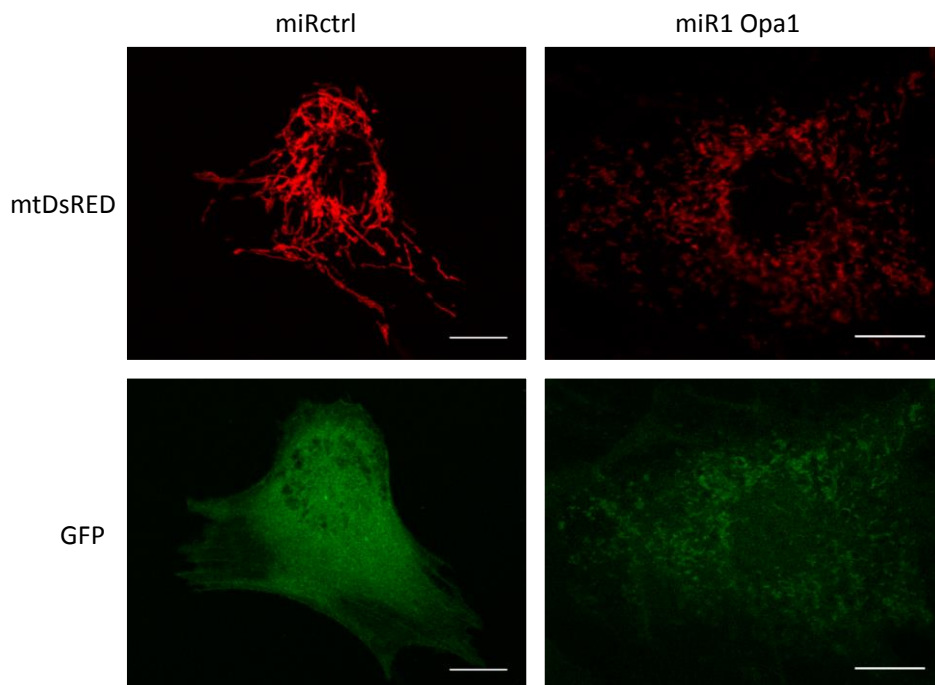


Figura 13. Morfologia mitocondrial observada en mioblasts C2C12 mtDsRed control i en mioblasts C2C12 mtDsRed amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Mioblasts C2C12 mtDsRed van ser transduïts 48h amb el miRctrl o el miR1 Opa1 abans de ser analitzats per microscòpia confocal *in vivo*. Les imatges són representatives de 5 experiments independents. Barra d'escala 10 μ m.

No obstant, mitjançant aquests vídeos no va ser possible confirmar si aquestes mitocòndries amb pèrdua de funció de Opa1 fusionaven menys o no, ja que no es disposava de tots els camps Z com per fer una visió tridimensional. Per tant, es va decidir utilitzar la tècnica del fotomarcatge d'una única mitocòndria (o grup de mitocòndries) dins d'una cèl·lula viva per fotoconversió de la proteïna GFP fotoactivable (mtPA-GFP) per avaluar la forma, la taxa de fusió mitocondrial i el moviment de la xarxa mitocondrial en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de la proteïna de fusió Opa1¹. D'aquesta manera, vam poder

¹ Per a poder realitzar aquest experiment, es van redissenyar i produir nous adenovirus control i adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 per eliminar la GFP, ja que sinó no s'hauria pogut

monitoritzar la taxa de fusió de les mitocòndries al llarg del temps mitjançant la dilució de la GFP (Figura 14 i 15).

Per exemple, si ens fixem en la Figura 14, tenim un perfil normal de fusió mitocondrial en mioblasts C2C12 control, on la GFP es dilueix al llarg del temps a mesura que les mitocòndries fotoactivades es van fusionant amb altres mitocòndries. Així doncs, ja als 30 minuts de la fotoactivació inicial tenim una caiguda d'un 50% en intensitat (Figura 16). En canvi, si mirem la Figura 15, veiem que aquestes mitocòndries són incapaces de fusionar, ja que no tenen la proteïna clau del procés de fusió de la membrana mitocondrial interna, és a dir, Opa1. Per tant, observem que no hi ha pràcticament pèrdua d'intensitat de la GFP que, als 30 minuts de la fotoactivació inicial, només és del 10% (Figura 16).

utilitzar el plasmidi que conté la mtPA-GFP. No obstant, els miRNA que contenen són exactament els mateixos que els utilitzats en els adenovirus amb GFP, emprats per la majoria d'experiments.

Cèl·lula muscular control

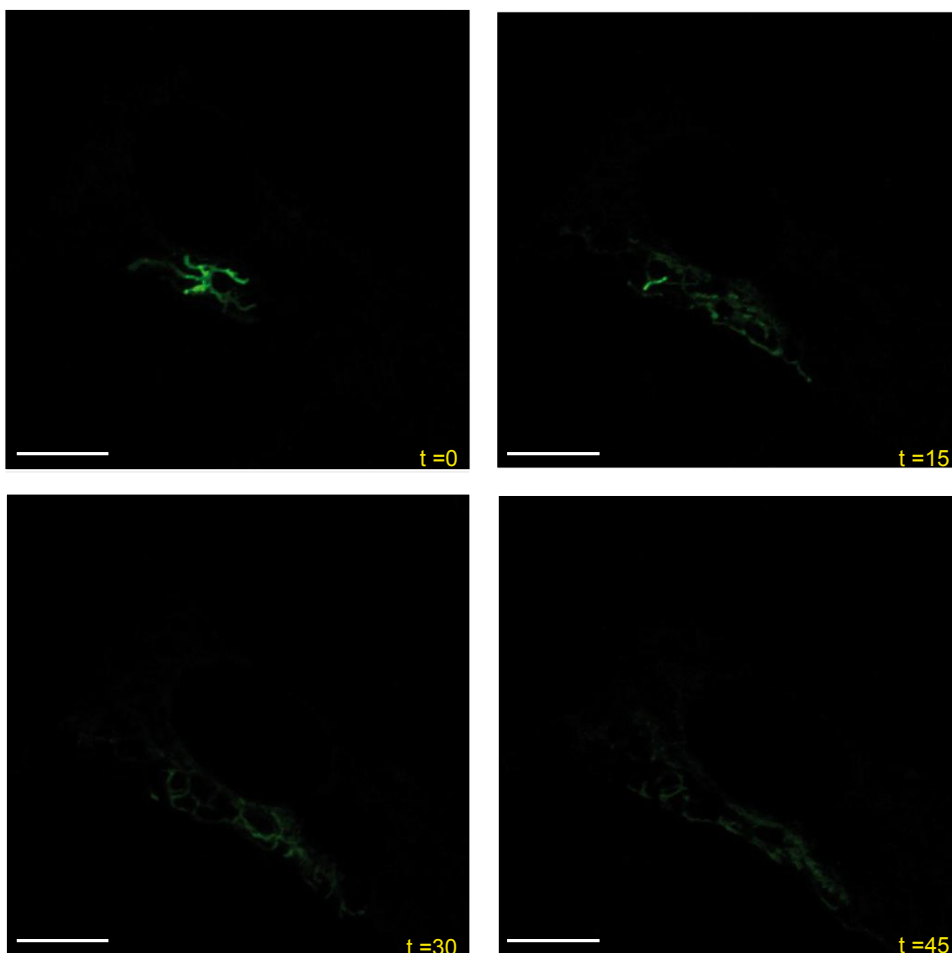


Figura 14. Assaig de fusió mitocondrial en mioblasts C2C12 control. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control i transfectats 24h abans de Dia 0 amb $1\mu\text{g}$ de plasmidi que conté la mtPA-GFP per posteriorment ser analitzats a Dia 0 per microscòpia confocal. Experiment representatiu de la fusió mitocondrial avaluada mitjançant la dilució de la GFP al llarg de 45 minuts a partir de la fotoconversió d'una única mitocòndria fotomarcada. Barra d'escala $10\mu\text{m}$.

Cèl·lula muscular amb pèrdua de funció de Opa1

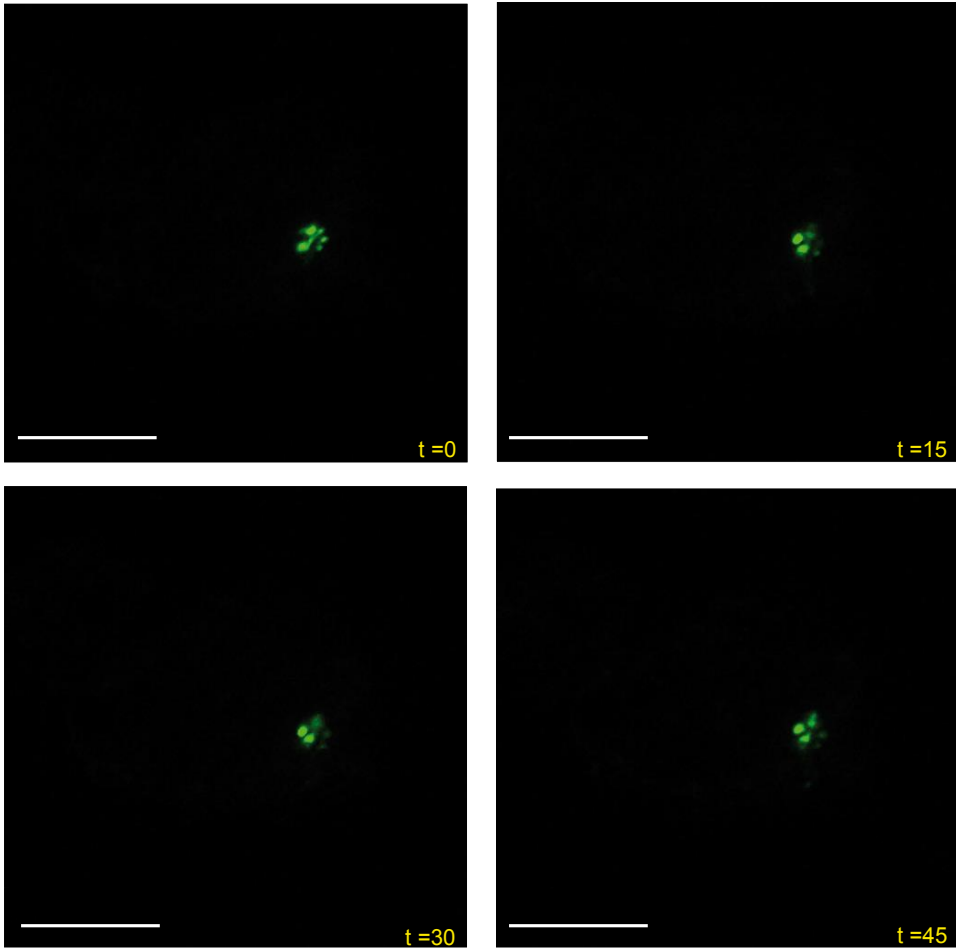


Figura 15. Assaig de fusió mitocondrial en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 i transfectats 24h abans de Dia 0 amb 1 μ g de plasmidi que conté la mtPA-GFP per posteriorment ser analitzats a Dia 0 per microscòpia confocal. Experiment representatiu de la fusió mitocondrial avaluada mitjançant la dilució de la GFP al llarg de 45 minuts a partir de la fotoconversió d'una única mitocòndria fotomarcada. Barra d'escala 10 μ m.

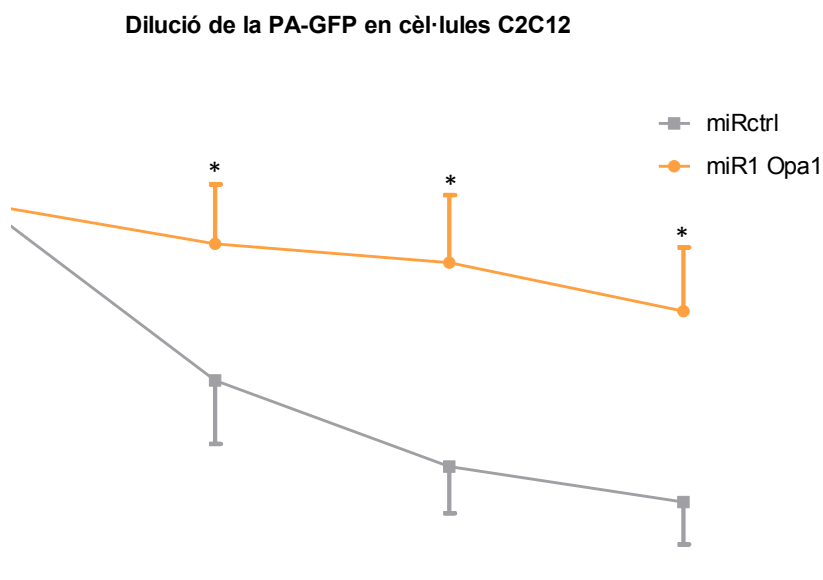


Figura 16. Quantificació de la fusió mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. Estimació de la fusió mitocondrial mitjançant la dilució de la GFP en mioblasts C2C12 control (línia gris) o amb pèrdua de funció de Opa1 (línia carbassa). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard d'un total de 30 mioblasts per condició, estudiats al llarg de 10 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

4.1.3 Efectes de la deficiència de Opa1 sobre la funció mitocondrial

4.1.3.1 Abundància mitocondrial

Per comprovar si la pèrdua de funció de Opa1 alterava la quantitat de mitocondries en mioblasts C2C12, es va quantificar el DNA mitocondrial (mtDNA) mitjançant *Real-Time PCR*. Així doncs, utilitzant encebadors específics, es van amplificar els gens Cox2 (subunitat II del complex IV) i SdhA (subunitat A del complex II), codificats pel genoma mitocondrial i el nuclear, respectivament. Tot i les dificultats per reproduir aquest experiment en concret i que no hi havia

diferències estadísticament significatives, si que es va observar una tendència a que els mioblasts amb pèrdua de funció de Opa1 tinguessin més quantitat de mitocondries (Figura 17).

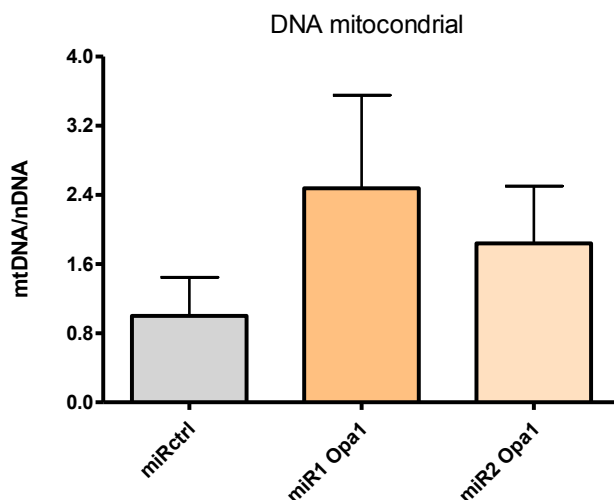


Figura 17. Determinació dels nivells de DNA mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Anàlisi per *Real-Time PCR* dels nivells de mtDNA relativitzats al nDNA mitjançant la utilització dels 'primers' específics Cox2 (subunitat II del complex IV pel mtDNA) i SdhA (subunitat A del complex II pel nDNA). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents.

4.1.3.2 Expressió d'altres proteïnes implicades en la dinàmica mitocondrial

Per tal de valorar si una caiguda en una proteïna tant important com Opa1 tenia un efecte en les altres proteïnes de la dinàmica mitocondrial, es va decidir mesurar els nivells proteics per *Western Blot* de les proteïnes de dinàmica mitocondrial més rellevants en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. Com es pot observar en la Figura 18 i 19, sembla ser que no hi ha canvis significatius en Mfn1 i Fis1 però si per Drp1, on hi ha una caiguda significativa del 45%, segurament pel fet d'intentar

compensar la menor fusió mitocondrial deguda a la pèrdua de funció de Opa1 amb una menor fissió mitocondrial. Sorpren el fet que l'expressió de Mfn2 també cau però únicament amb el miR1 O1, indicant que l'expressió de Mfn2 podria anar lligada a la de Opa1.

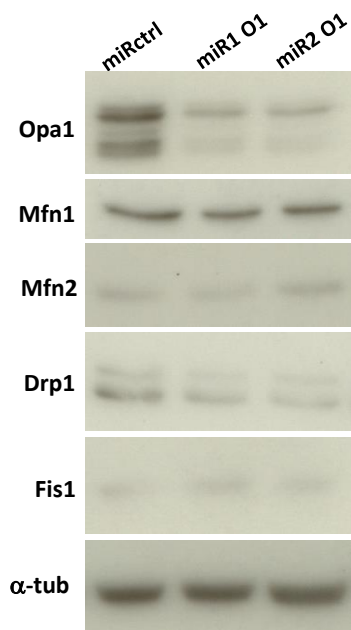


Figura 18. Determinació dels nivells de proteïna de Opa1, Mfn1, Mfn2, Drp1 i Fis1 en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 i Dia 1. Experiment representatiu de l'anàlisi per *Western Blot* dels nivells de les diferents proteïnes involucrades en dinàmica mitocondrial (Opa1, Mfn1, Mfn2, Drp1 i Fis1) en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1.

Proteïnes de dinàmica mitocondrial

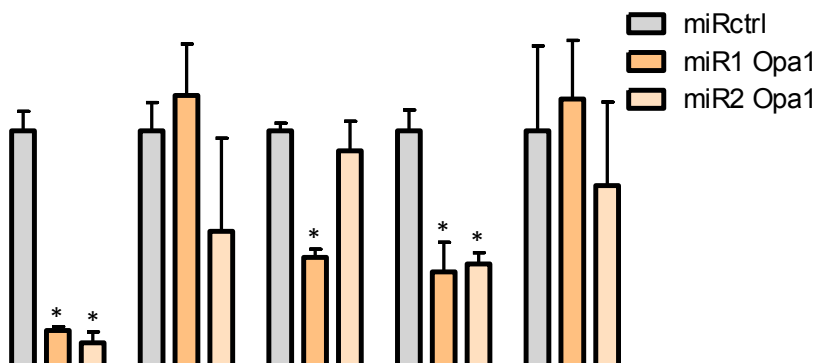


Figura 19. Determinació dels nivells relatius de proteïna de Opa1, Mfn1, Mfn2, Drp1 i Fis1 en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents, obtinguts de l'anàlisi per densitometria dels nivells relatius de les proteïnes Opa1, Mfn1, Mfn2, Drp1 i Fis1 corregits per la α -tubulina de mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40 μ g de proteïna provinents de lisats totals de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 i posteriorment destriats per citometria de flux. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

4.1.3.3 Potencial de membrana mitocondrial

Seguidament, es va mesurar el potencial de membrana mitocondrial mitjançant el marcatge amb el colorant tetrametil rodamina metil ester (TMRM) amb i sense la utilització del CCCP per corregir els valors obtinguts. La disminució de l'expressió de Opa1 va lligada amb una caiguda prou marcada (entre un 25 i un 30%) en el potencial de membrana mitocondrial, indicant certa disfunció en les mitocondries (Figura 20).

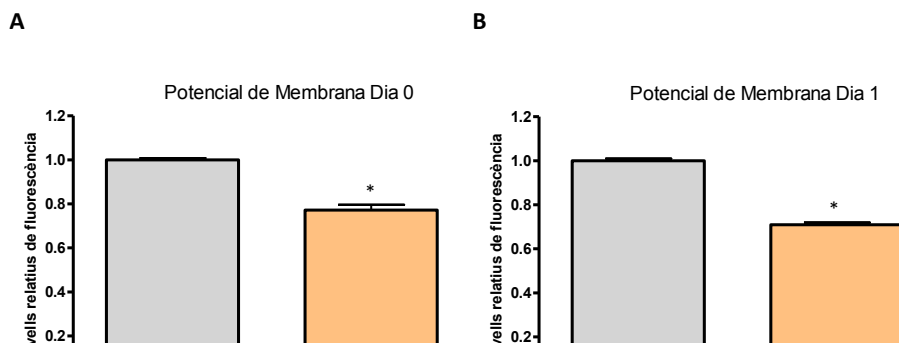


Figura 20. Determinació del potencial de membrana mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 i Dia 1. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 i analitzats per citometria de flux mesurant els nivells d'intensitat de fluorescència obtinguts mitjançant el colorant TMRM. Els valors es van obtenir restant els valors obtinguts obtinguts amb el colorant TMRM amb els obtinguts emprant el TMRM+CCCP en mioblasts C2C12 control o amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 (**A**) i Dia 1 (**B**). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

4.1.3.4 Expressió d'algunes subunitats dels complexos de la cadena respiratòria

Per avaluar els efectes de la pèrdua de funció de Opa1 sobre la cadena respiratòria en cèl·lules C2C12, es va decidir analitzar l'expressió a nivell de proteïna d'algunes subunitats dels diferents complexos que en formen part. Així doncs, es van analitzar per *Western Blot* els nivells de les subunitats Ndufa9, SdhA, *Subunit core 1*, Cox4 i Atp5a dels complexos I, II, III, IV i V, respectivament. Com es pot observar a Dia 0 i a Dia 1 de diferenciació, no hi ha canvis molt destacables en línies generals excepte per les subunitats dels complexos IV i V a Dia 1, amb una caiguda prou significativa en els nivells d'expressió d'aquestes subunitats en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 i que es va mantenir al llarg de la miogènesi (Figura 21 i 22). Un cop

aquests mioblasts van diferenciar a miotubs, es va observar que els miotubs de Dia 4 amb pèrdua de funció de Opa1 mostraven també una caiguda destacable dels nivells proteics de les subunitats dels complexos I i III, a part de les mencionades anteriorment (Figura 21 i 22). Aquest fet podria ser degut al simple fet que els miotubs no es formen correctament.

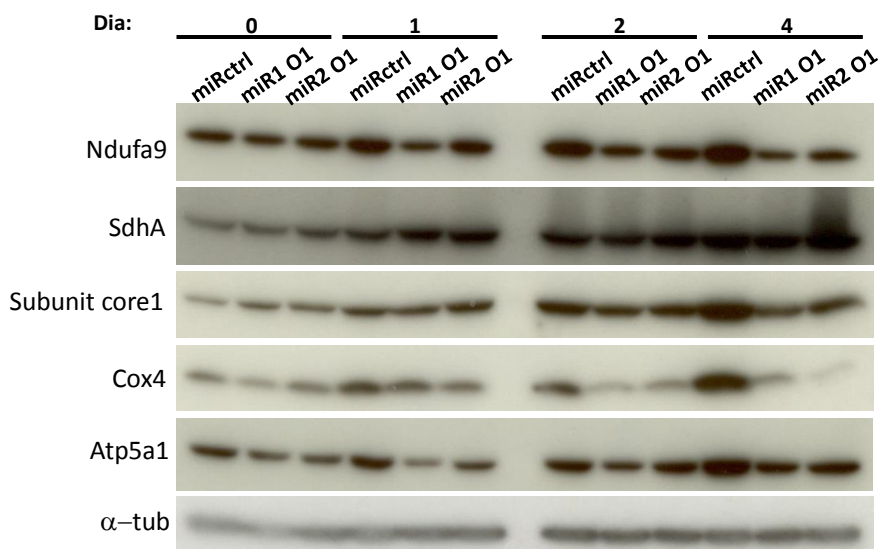


Figura 21. Determinació dels nivells de proteïna d'algunes subunitats dels diferents complexos de la cadena respiratòria durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control i en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. Experiment representatiu de l'anàlisi per *Western Blot* de Ndufa9 (complex 1), SdhA (complex II), *Subunit core1* (complex III), Cox4 (complex IV) i Atp5a1 (complex V) a Dia 0, 1, 2 i 4 en cèl·lules C2C12 transduïdes 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 (miR1 i miR2) i diferenciades a partir d'aleshores fins a Dia 4.

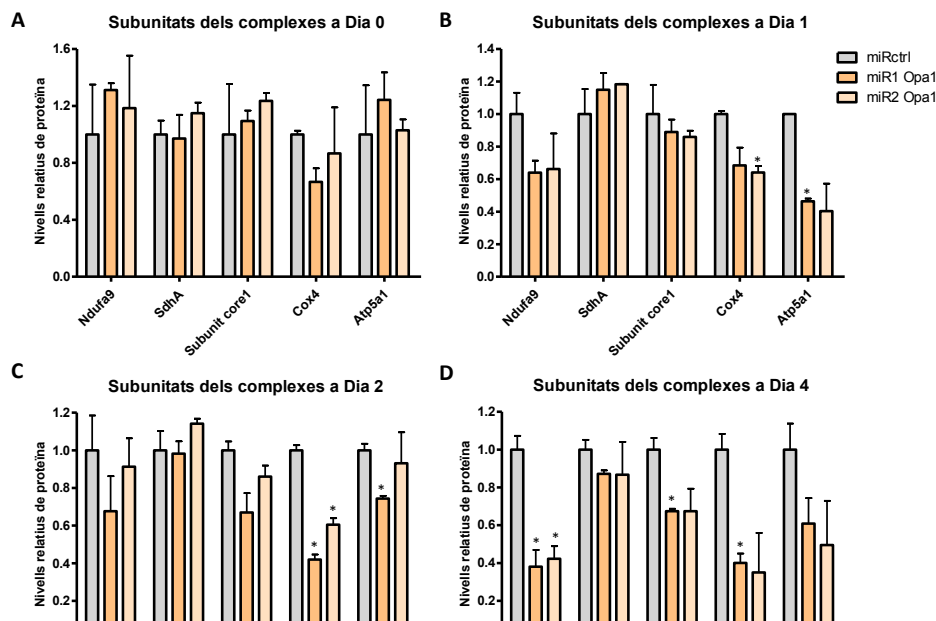


Figura 22. Determinació dels nivells relatius de proteïna d'algunes subunitats dels diferents complexos de la cadena respiratòria durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control i en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents, obtinguts de l'anàlisi per densitometria dels nivells relatius de les proteïnes Ndufa9 (complex 1), SdhA (complex II), *Subunit core1* (complex III), Cox4 (complex IV) i Atp5a1 (complex V) corregits per la α -tubulina a Dia 0 (A), Dia 1 (B), Dia 2 (C) i Dia 4 (D) en cèl·lules C2C12 transduïdes 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 (miR1 i miR2) i diferenciació a partir d'aleshores fins a Dia 4. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb una cua de distribució.

4.1.3.5 Taxa del consum d'oxigen i activitat glicolítica

Per analitzar l'impacte de la disminució en la expressió de Opa1 sobre el metabolisme energètic cel·lular, es van dur a terme experiments de respirometria. A continuació, es mostra un exemple d'un experiment (Figura 23).

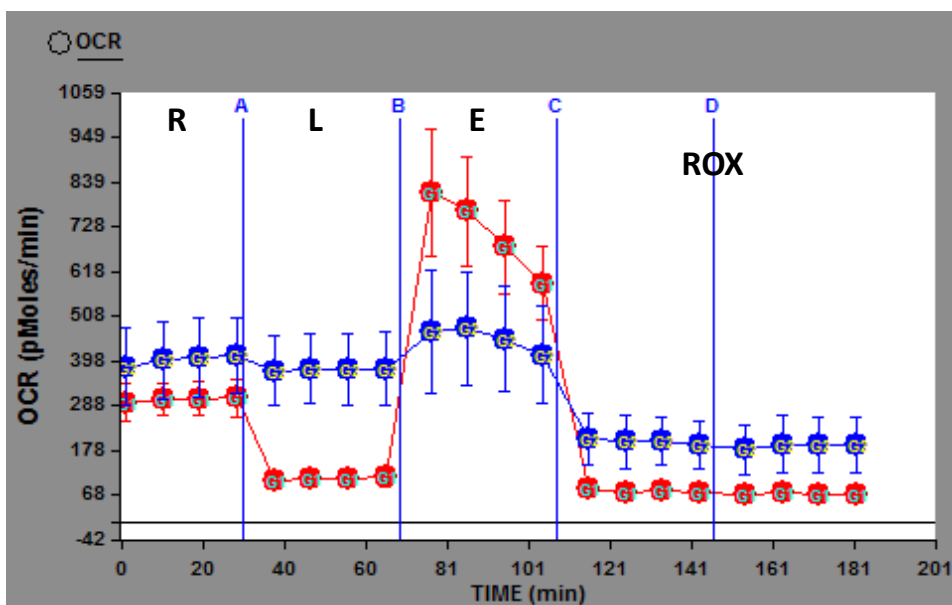


Figura 23. Assaig de respirometria per mesurar els nivells de consum d'oxigen en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Experiment representatiu on es mostren els valors de consum d'oxigen de mioblasts control (vermell) o amb pèrdua de funció de Opa1 (blau) en diferents estats respiratoris: Rutina (R), *proton leak* (L), capacitat respiratòria màxima (E) i respiració no mitocondrial (ROX). En les línies verticals blaves amb lletres s'indica el moment on s'han afegit les diferents drogues: Oligomicina (A), FCCP (B), Rotenona (C) i Antimicina A (D). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard.

Els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1, presentaven un lleuger major consum d'oxigen respecte als control en rutina ($19,02 \pm 1,5$ pmol O_2 /min· μ g vs $22,93 \pm 2,28$ pmol O_2 /min· μ g), tot i que sense ser significatiu (Figura 24). En canvi, presentaven un increment molt marcat en el consum d'oxigen quan es va inhibir l'ATP sintetasa amb l'oligomicina ($6,68 \pm 0,34$ pmol O_2 /min· μ g vs $21,48 \pm 1,96$ pmol O_2 /min· μ g), indicant una forta disfunció, ja que la majoria del consum d'oxigen en rutina no està associat a la producció d'ATP. A més, presentaven una disminució molt marcada en el consum d'oxigen en afegir el desacoblant FCCP ($51,28 \pm 5,56$ pmol O_2 /min· μ g vs $26,77 \pm 3,56$ pmol O_2 /min· μ g), utilitzat per veure la capacitat respiratòria màxima. Finalment, el consum d'oxigen residual o no mitocondrial (ROX), es va obtenir inhibint el

complex I amb Rotenona i inhibint el complex III amb Antimicina A. En aquest cas, els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 també tenien el consum d'oxigen bastant augmentat respecte als control ($4,34 \pm 0,41$ pmol $O_2/\text{min} \cdot \mu\text{g}$ vs $10,71 \pm 1,61$ pmol $O_2/\text{min} \cdot \mu\text{g}$) (Figura 24).

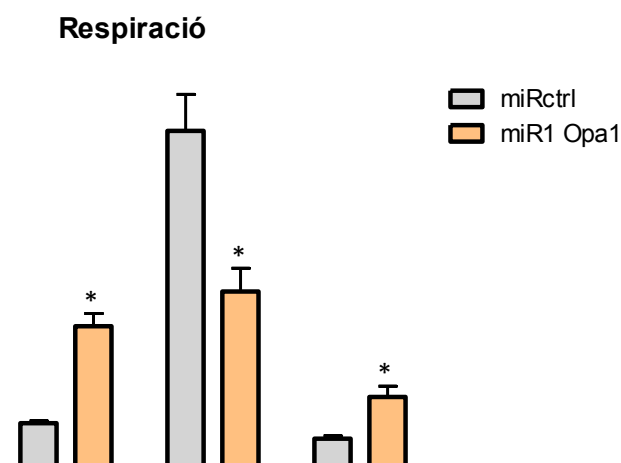


Figura 24. Determinació dels nivells de respiració en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Anàlisi dels nivells de consum d'oxigen mitocondrial en mioblasts C2C12 control o amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 mitjançant el XF24 *Extracellular Flux Analyzer* de Seahorse Bioscience. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1, posteriorment destriades per citometria de flux i finalment sembrades en plaques per ser analitzades. Es va utilitzar com a substrat 5mM de glucosa. El *proton leak* (respiració independent de la síntesi d'ATP) es va induir afegint 1,25 μM d'oligomicina, per inhibir el complex V. La capacitat màxima del sistema es va induir afegint 1 μM de FCCP (un desacoblador). ROX (respiració no mitocondrial) es va induir afegint 0,1 μM de Rotenona (inhibidor del complex I) i 0,1 μM d'Antimicina A (inhibidor del complex III). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte cada control, obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

A més, restant ROX dels valors obtinguts en cada un dels estats, s'obté específicament el consum d'oxigen mitocondrial. Així doncs, els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 presentaven un lleuger menor consum d'oxigen mitocondrial en rutina (a diferència del mostrat anteriorment, que era superior) respecte als control ($14,69 \pm 1,70$ pmol O_2 /min· μ g vs $12,22 \pm 1,23$ pmol O_2 /min· μ g), tot i que sense ser significatiu (Figura 25). En canvi, seguien presentant un increment molt marcat en el consum d'oxigen mitocondrial quan es va inhibir l'ATP sintetasa amb l'oligomicina ($2,34 \pm 0,30$ pmol O_2 /min· μ g vs $10,77 \pm 0,82$ pmol O_2 /min· μ g), indicant una forta disfunció, ja que la majoria del consum d'oxigen en rutina no està associat a la producció d'ATP. De la mateixa manera, presentaven una disminució molt marcada en el consum d'oxigen mitocondrial en afegir el desacoblant FCCP ($46,94 \pm 5,79$ pmol O_2 /min· μ g vs $16,06 \pm 2,21$ pmol O_2 /min· μ g), utilitzat per veure la capacitat respiratòria màxima (Figura 25).

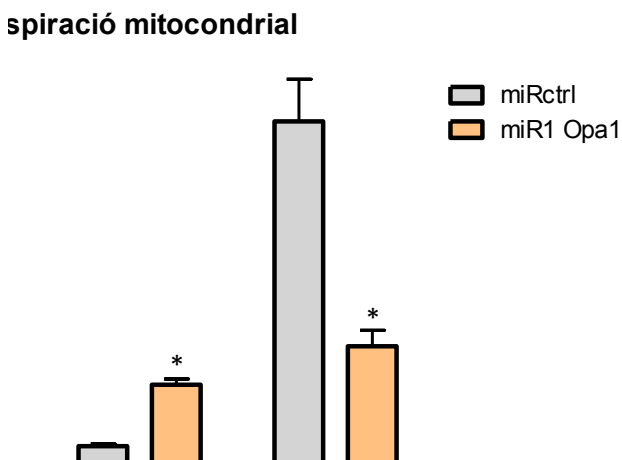


Figura 25. Determinació dels nivells de respiració mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Anàlisi dels nivells de consum d'oxigen mitocondrial en mioblasts C2C12 control o amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 mitjançant el XF24 *Extracellular Flux Analyzer* de Seahorse Bioscience. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1, posteriorment destriades per citometria de flux i finalment sembrades en plaques per ser analitzades. Es va utilitzar com a substrat 5mM de glucosa. El *proton leak* (respiració independent de la síntesi d'ATP) es va induir afegint 1,25 μM d'oligomicina, per inhibir el complex V. La capacitat màxima del sistema es va induir afegint 1 μM de FCCP (un desacoblant). ROX (respiració no mitocondrial) es va induir afegint 0,1 μM de Rotenona (inhibidor del complex I) i 0,1 μM d'Antimicina A (inhibidor del complex III). Per tal d'obtenir el consum d'oxigen mitocondrial, es va restar el valor de ROX del valor absolut del consum d'oxigen. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ respecte cada control, obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

A partir d'aquests valors, es van calcular les *Flux control ratios*, que ens donen informació sobre el grau d'acoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. Respecte al *Routine Flux Control Ratio (R/E)* i al *Leak Flux Control Ratio (L/E)*, es va observar un increment molt marcat en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 (Figura 26), indicant que aquests mioblasts treballaven pràcticament al màxim de la seva capacitat (Figura 26A) i que, a més, tenien un augment molt gran del *proton leak* respecte la capacitat respiratòria màxima, indicant un fort desacoblament (Figura 26B). De fet, si ens fixem en els valors absoluts de consum d'oxigen mitocondrial destinats a la síntesi d'ATP, es pot observar que aquest consum d'oxigen mitocondrial en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 és més de 8 cops inferior si ho comparem amb els mioblasts C2C12 control (Figura 27). A més, també es va observar una disminució de la *Phosphorylation Respiratory Control Ratio ((R-L)/E)*, indicant que la respiració associada a la producció d'ATP respecte la capacitat màxima es menor (Figura 26C).

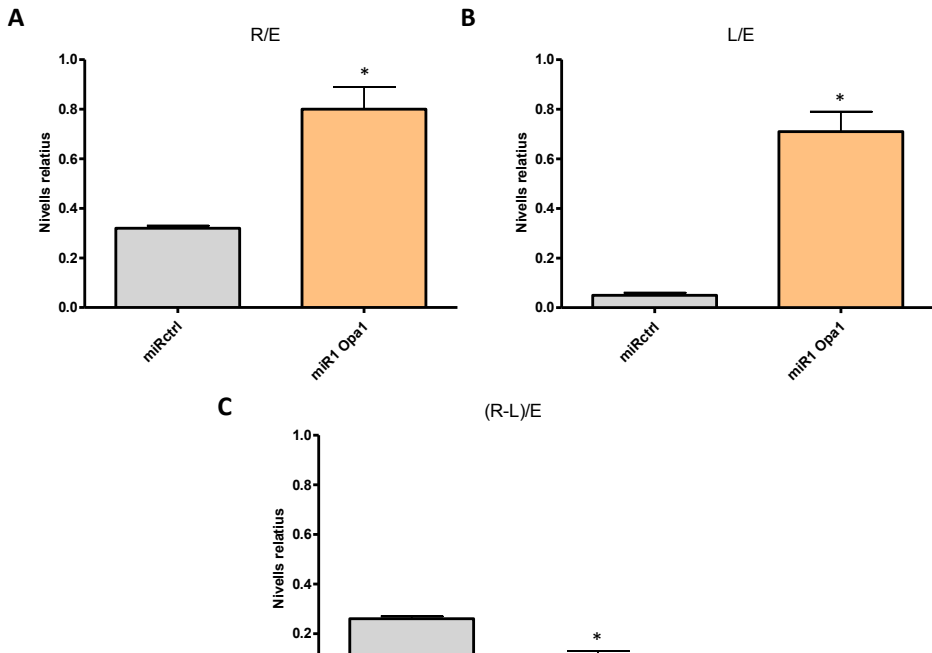


Figura 26. Determinació de les Flux Control Ratios en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. La **(A)** Routine Flux Control Ratio (R/E), la **(B)** Leak Flux Control Ratio (L/E) i la **(C)** Phosphorylation Respiratory Control Ratio ((R-L)/E) es van calcular a partir dels valors de consum d'oxigen mitocondrial obtinguts i mostrats anteriorment (Figura 20); on R és el consum d'oxigen en rutina, L en l'estat de *proton leak* i E en l'estat de capacitat respiratòria màxima. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

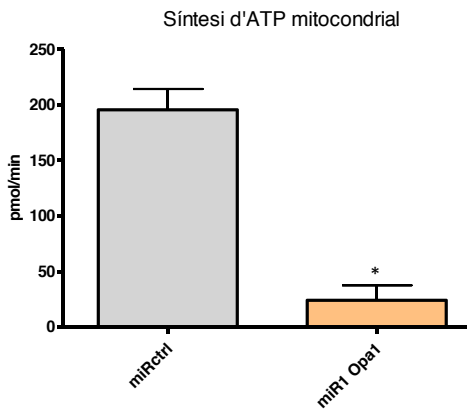


Figura 27. Determinació dels valors absoluts de consum d'oxigen mitocondrial destinats a la síntesi d'ATP mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. El valor absolut de consum d'oxigen mitocondrial destinat a la síntesi d'ATP mitocondrial es va calcular restant el valor del consum d'oxigen absolut en estat de *proton leak* (L) amb l'obtingut en l'estat de *rutina* (R) amb l'obtingut en l'estat de *proton leak* (L). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,001$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

Per una altra banda, es va voler veure si aquesta disminució en el consum d'oxigen mitocondrial per a la síntesi d'ATP era compensada per la glicòlisi. A continuació, es mostra un exemple d'un experiment (Figura 28).

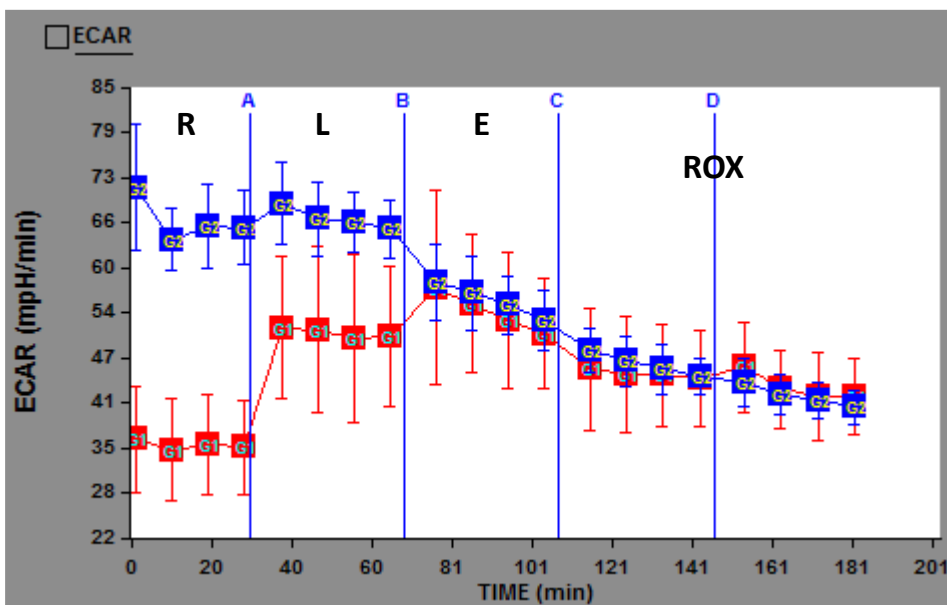


Figura 28. Assaig de respirometria per mesurar els nivells de ECAR (taxa d'acidificació del medi extracel·lular) en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1

a Dia 0. Experiment representatiu on es mostren els valors de ECAR de mioblasts control (vermell) o amb pèrdua de funció de Opa1 (blau) en diferents estats respiratoris: Rutina (R), *proton leak* (L), capacitat respiratòria màxima (E) i respiració no mitocondrial (ROX). En les línies verticals blaves amb lletres s'indica el moment on s'han afegit les diferents drogues: Oligomicina (A), FCCP (B), Rotenona (C) i Antimicina A (D). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard.

Així doncs, es va decidir estudiar el flux glicolític en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. Com es pot observar en la Figura 29, es veu que en l'estat de rutina aquest flux glicolític és dues vegades superior en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 respecte als control, suggerint que aquesta via està augmentada per poder compensar la falta de síntesi d'ATP mitocondrial.

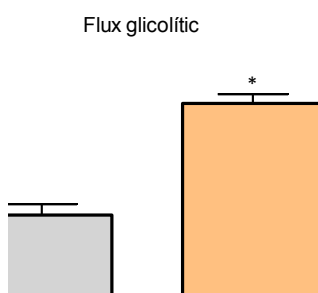


Figura 29. Determinació del flux glicolític en rutina de mioblasts C2C12 control i mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Anàlisi de la ECAR en rutina de mioblasts C2C12 control o amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 mitjançant el XF24 *Extracellular Flux Analyzer* de Seahorse Bioscience. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1, posteriorment destriades per citometria de flux i finalment sembrades en plaques per ser analitzades. Es va utilitzar com a substrat 5mM de glucosa. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

4.1.3.6 Producció de ROS

Degut a que els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 tenien un fort desacoblament entre el consum d'oxigen mitocondrial en rutina i el destinat a la producció d'ATP, es va pensar que, en aquestes circumstàncies, s'estarien produint més anions superòxid. Així doncs, es va decidir mesurar els nivells de anions superòxid produïts mitjançant la sonda *Mitox* per citometria de flux. Sorprenentment, es va veure una caiguda del 30% en la producció d'anions superòxid en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 i d'un 20% a Dia 1, essent significatiu únicament a Dia 0 (Figura 30). Així doncs es va decidir mirar els nivells de peròxid d'hidrogen en lisats totals fent servir la sonda *Amplex Red*, on es va apreciar que els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 produïen un 26% més de peròxid d'hidrogen en comparació amb els mioblasts C2C12 control (Figura 31). Això ens va fer pensar que, o bé l'enzim superòxid dismutasa (SOD) catalitzava ràpidament el pas d'anions superòxid produïts pel sistema OXPHOS a peròxid d'hidrogen o que aquest peròxid d'hidrogen no provenia dels anions superòxid produïts pel sistema OXPHOS. Per tant, es va decidir utilitzar la sonda *mitoHyPer* mitjançant l'ús d'un adenovirus, que també contenia en la part codificant la GFP pel seu correcte monitoratge *'in vivo'*.

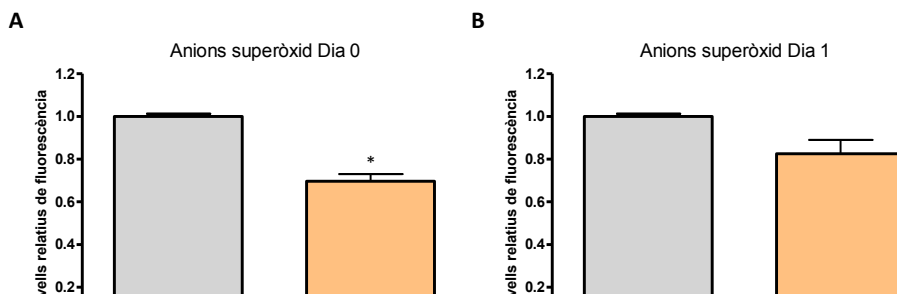


Figura 30. Determinació de la producció d'anions superòxid de les mitocondries en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 i Dia 1. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 i analitzats per citometria de flux mesurant els nivells d'intensitat de fluorescència obtinguts mitjançant el colorant *Mitosox* en mioblasts C2C12 a Dia 0 (A) i a Dia 1 (B). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,001$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

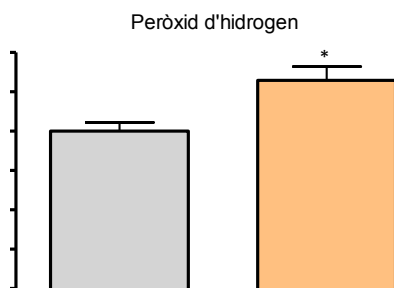


Figura 31. Determinació de la producció de peròxid d'hidrogen en lisats totals de mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1, posteriorment lisats a Dia 0 i finalment analitzats per espectrofotometria a 560nm mitjançant l'ús de la sonda *Amplex Red*. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

Si ens fixem en la Figura 32 i 33, es pot veure que els mioblasts C2C12 de Dia 0 amb pèrdua de funció de Opa1² presenten uns nivells de peròxid d'hidrogen mitocondrials més alts *'in vivo'* si es comparen amb els observats en mioblasts C2C12 control, confirmant que aquest peròxid d'hidrogen prové de la sobreproducció d'anions superòxid probablement com a conseqüència del desacoblament del sistema OXPHOS i suggerint que és la senyal clau que desencadena la menor diferenciació miogènica d'aquests mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1.

² Per a poder realitzar aquest experiment, es van redissenyar i produir nous adenovirus control i adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 per eliminar la GFP, ja que sinó no s'hauria pogut utilitzar l'adenovirus que conté la mitoHyPer. No obstant, els miRNA que contenen són exactament els mateixos que els utilitzats en els adenovirus amb GFP, emprats per la majoria d'experiments.

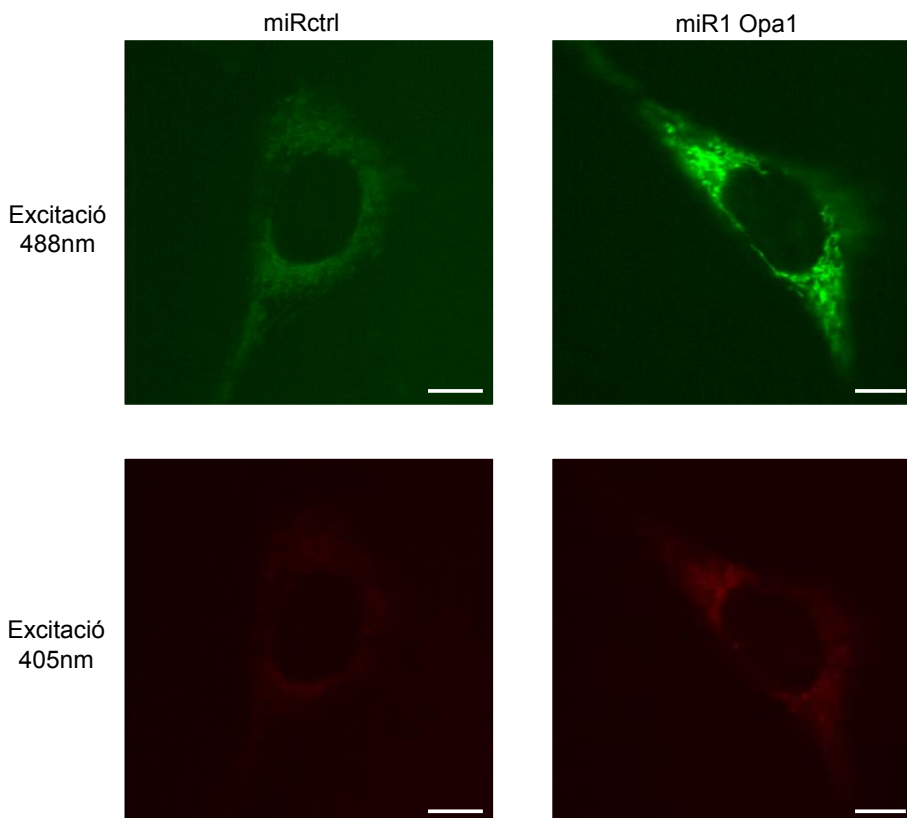


Figura 32. Determinació de la producció de peròxid d'hidrogen *'in vivo'* en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 més un adenovirus que conté la mitoHyPer (doble transducció). Posteriorment van ser analitzats per microscòpia confocal *'in vivo'*, obtenint en una única ona d'emissió a 495nm dues fluorescències diferents a partir de dues ones d'excitació diferents (a 405nm i a 488nm). Les imatges són representatives de 2 experiments independents, analitzant 50 mioblasts per cada un d'ells. Barra d'escala 10 μ m.

Finalment i per tal d'avaluar el nivell de dany oxidatiu dels mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1, es va decidir mirar per *Western Blot* la carbonilació de proteïnes, ja que es tracta d'un dany oxidatiu irreversible i lligat a la pèrdua de funcionalitat proteica. Tot i que ja s'ha demostrat que aquests mioblasts amb pèrdua de funció de Opa1 tenien uns nivells de peròxid

d'hidrogen més elevats que els mioblasts controls, no es van apreciar diferències en quan als nivells de carbonilació de proteïnes (Figura 34).

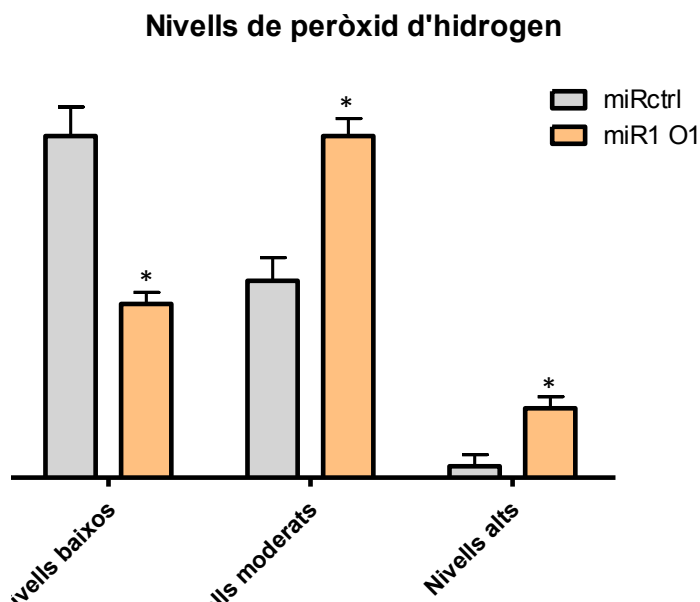


Figura 33. Quantificació dels nivells de peròxid d'hidrogen 'in vivo' en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 més un adenovirus que conté la mitoHyPer (doble transducció). Tant pels mioblasts C2C12 control com pels mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0, es van obtenir dues fluorescències diferents a 495nm a partir les dues ones d'excitació diferents (a 405nm i a 488nm). Tot seguit, es va fer la relació 488/405 i els valors es van dividir en 3 grups diferents. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard d'un total de 100 mioblasts analitzats en dos experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb una cua de distribució.

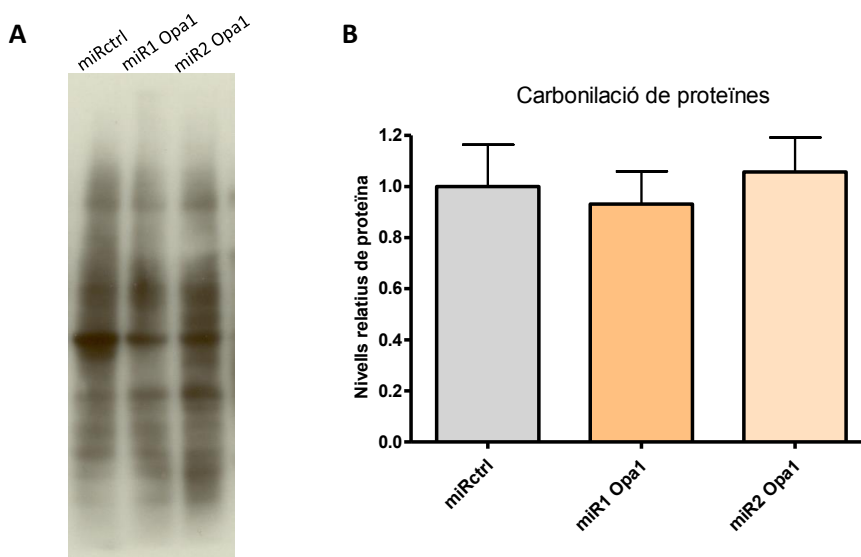


Figura 34. Determinació dels nivells de carbonilació de proteïnes en mioblasts C2C12 control i de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1, posteriorment destriades per citometria de flux i finalment lisades per realitzar el *Western Blot*. **(A)** Experiment representatiu dels nivells de carbonilació de proteïnes en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 20µg de proteïna provinents de lisats totals. **(B)** El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents.

4.1.4 Efectes de la deficiència de Opa1 sobre la diferenciació miogènica

4.1.4.1 Morfologia durant la diferenciació miogènica

Per tal de comprovar la rellevància de Opa1 durant la miogènesi, es va observar la morfologia a nivell cel·lular durant tot el procés de diferenciació (Figura 35). Aparentment, no es van veure canvis durant els primers dos dies però si ens fixem a Dia 4, es poden observar unes diferències molt significatives. D'aquesta manera, a la primera columna de la Figura 36 podem veure un procés de

diferenciació normal en cèl·lules C2C12 control, observant uns miotubs llargs i gruixuts a Dia 4. En canvi, si ens fixem en la segona i tercera columna, aquest procés no es finalitza per complet, ja que els miotubs que es formen en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 són molt més prim i curts, els quals es poden confondre amb miòcits (miotubs immadurs típics de Dia 2 de diferenciació).

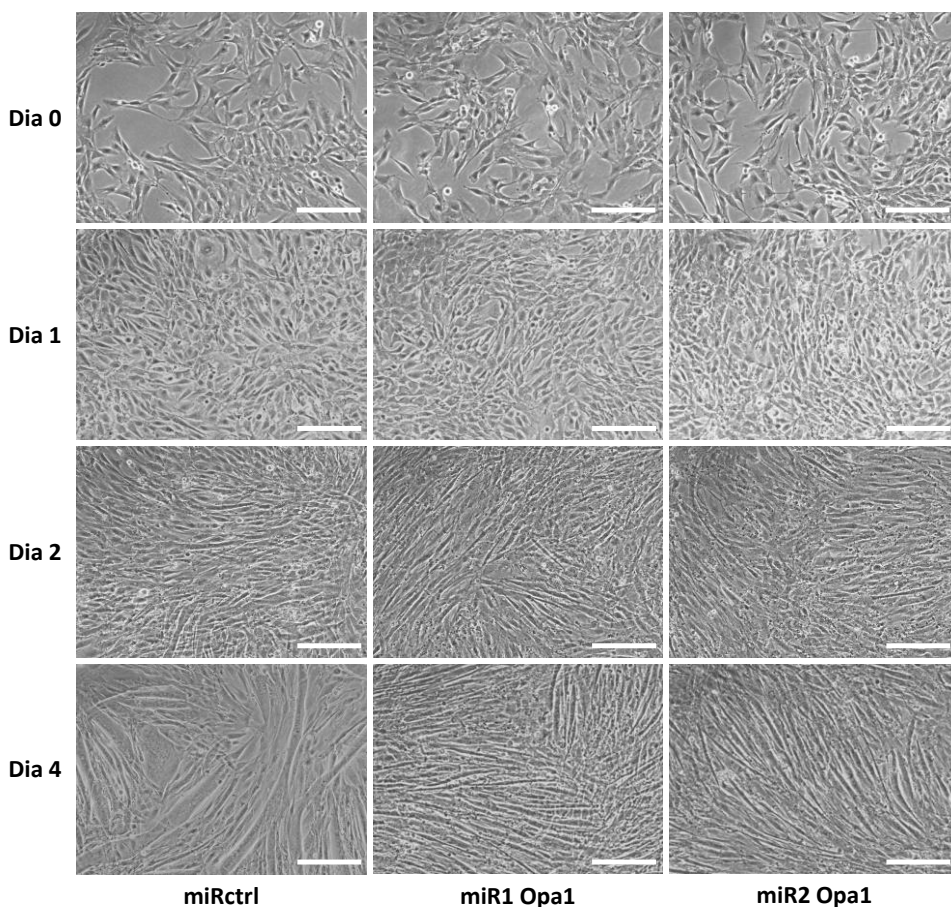


Figura 35. Canvis morfològics observats durant la diferenciació miogènica a partir de mioblasts C2C12 control i de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. Experiment representatiu de l'anàlisi morfològic a Dia 0, 1, 2 i 4 en cèl·lules C2C12 transduïdes 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 i diferenciades a partir d'aleshores fins a Dia 4. Barra d'escala 200µm.

4.1.4.2 Marcadors de diferenciació miogènica

Després de comprovar morfològicament per microscòpia òptica que els mioblasts amb pèrdua de funció de Opa1 no diferenciaven correctament, es va decidir confirmar aquests canvis mitjançant l'anàlisi per *Real-Time PCR* (Figura 36) i *Western Blot* (Figura 38 i 39) d'una sèrie de marcadors tardans de diferenciació. Com es pot observar en aquestes figures, es van analitzar per *Real-Time PCR* una sèrie de gens (alguns involucrats en la maquinària de contracció muscular i l'homeòstasi de calci específica de múscul (Casq1, Chrne, Mybpc2, Myh4, Serca1, Serca2, i Tnnt3) i altres independents del tipus de fibra (Cav3 i Gys), obtenint resultats similars per tots ells, és a dir, presentant una reducció dels seus nivells d'expressió des d'un 60% fins a un 90%. A més, si s'observa l'expressió proteica de marcadors tardans de diferenciació típics de miotubs madurs tal i com la Caveolina 3 (Cav3) o la cadena pesada de la miosina (MHC), es veu una reducció de més del 90%, evidenciant una clara alteració en la miogènesi.

Per tal de descobrir quin era el pas clau que estava involucrat en aquesta alteració en la diferenciació, es va analitzar el perfil d'inducció de 2 gens màster de diferenciació muscular (MyoD i Miogenina) en cèl·lules C2C12 control i en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 durant tot el procés de miogènesi per *Real-Time PCR* (Figura 37) i per *Western Blot* (Figura 38 i 39). Com es pot observar en la Figura 37A, 38 i 39, l'expressió de MyoD en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 és normal a l'inici de la diferenciació però es redueix de manera molt marcada durant el procés, sent significatiu a nivells proteics a partir de Dia 1. En canvi, sota les mateixes condicions, l'expressió de la Miogenina estava molt reduïda tant per mRNA com per proteïna ja des de Dia 0, sent significatiu a partir de Dia 1 (Figura 37B, 38 i 39).

Gens específics de múscul

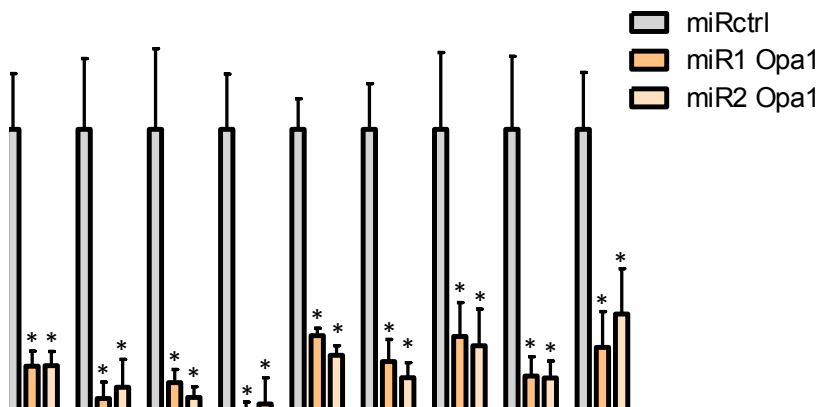


Figura 36. Determinació dels nivells de mRNA de gens específics de múscul en miotubs C2C12 control i en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. Anàlisi per *Real-Time PCR* dels nivells de Calsequestrina 1, receptor colinèrgic, glicogen sintasa, proteïna d'unió a miosina, cadena pesada de la miosina 4, SERCA1, SERCA2, troponina T tipus 3 i Caveolina 3 relativitzats a ARP (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

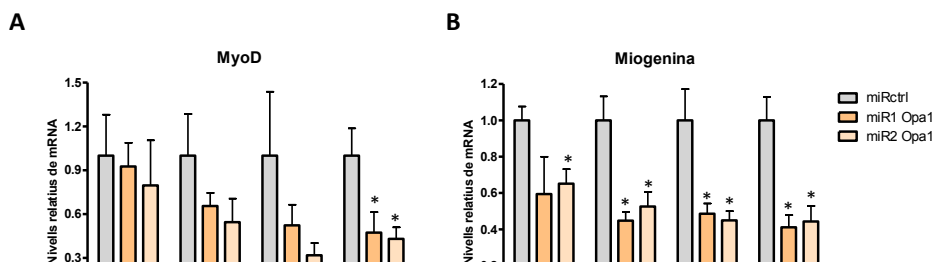


Figura 37. Determinació dels nivells de mRNA de MyoD i Miogenina (gens màster) durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control i en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. Anàlisi per *Real-Time PCR* dels nivells de MyoD (A) i Miogenina (B) relativitzats a ARP (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 4 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

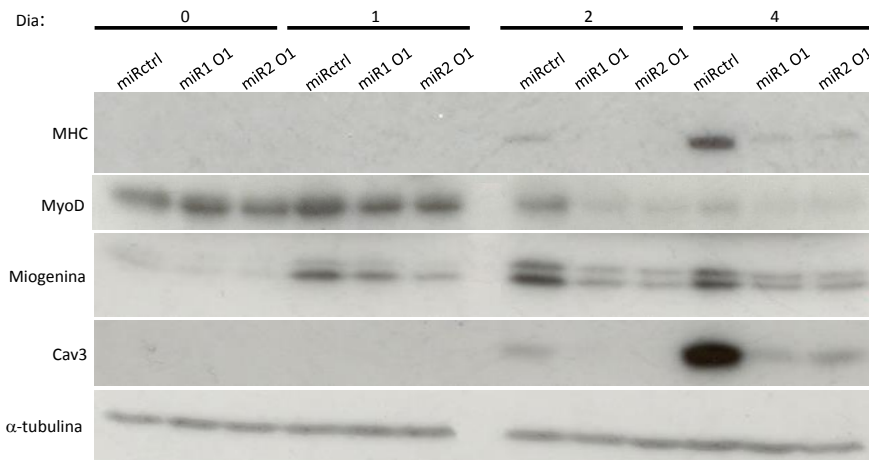


Figura 38. Determinació dels nivells de proteïna de MyoD i Miogenina (marcadors primerencs) i de Cav3 i la MHC (marcadors tardans) durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control i en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1. Anàlisi per *Western Blot* de diferents marcadors miogènics a Dia 0, 1, 2 i 4 en cèl·lules C2C12 transduïdes 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 i diferenciades a partir d'aleshores fins a Dia 4. Experiment representatiu dels nivells de MyoD, Miogenina, Caveolina 3 i la MHC en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de cèl·lules C2C12.

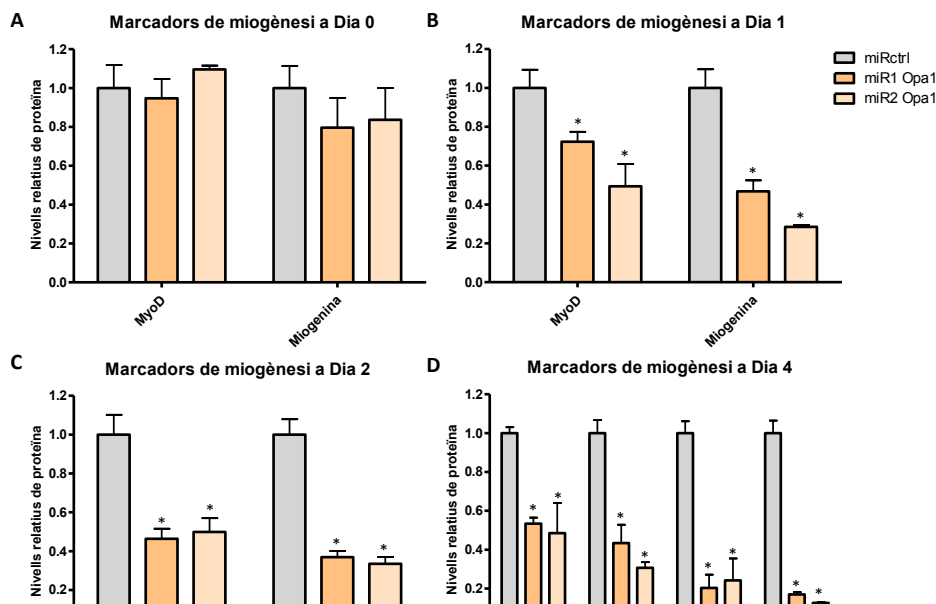


Figura 39. Determinació dels nivells relatius de proteïna MyoD, Miogenina, MHC i Cav3 durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control i amb pèrdua de funció de Opa1. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 4 experiments independents, obtinguts de l'anàlisi per densitometria dels nivells relatius de les proteïnes MyoD, Miogenina, MHC i Cav3 corregits per la α -tubulina a Dia 0 (A), Dia 1 (B), Dia 2 (C) i Dia 4 (D) en cèl·lules C2C12 transduïdes 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 (miR1 i miR2) i diferenciades a partir d'aleshores fins a Dia 4. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb una cua de distribució.

4.1.4.3 Activitat transcripcional de factors clau de miogènesi

Per determinar si aquesta disminució en la expressió de marcadors tant primerencs com tardans en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 tenia lloc per una reducció en l'activació específica del promotor de la Miogenina, es van realitzar experiments de cotransfecció amb un plasmidi que contenia un fragment de 184bp del promotor murí de la Miogenina, el qual controlava l'expressió del gen reporter luciferasa, i un plasmidi que conté la Renilla (utilitzada com a gen *housekeeping*) (Figura 40). A més, es va dur a

terme un altre experiment on es va analitzar l'activitat transcripcional d'un constructe quimèric que consistia en el domini d'unió Gal4 (Gal4 DBD), el qual controla l'expressió del gen reporter luciferasa, fusionat a MyoD (Gal4 DBD-MyoD), on també es va utilitzar la Renilla com a gen *housekeeping* (Figura 41). En ambdós casos, es veu una reducció en l'activitat transcripcional d'un 50% en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 respecte els controls.

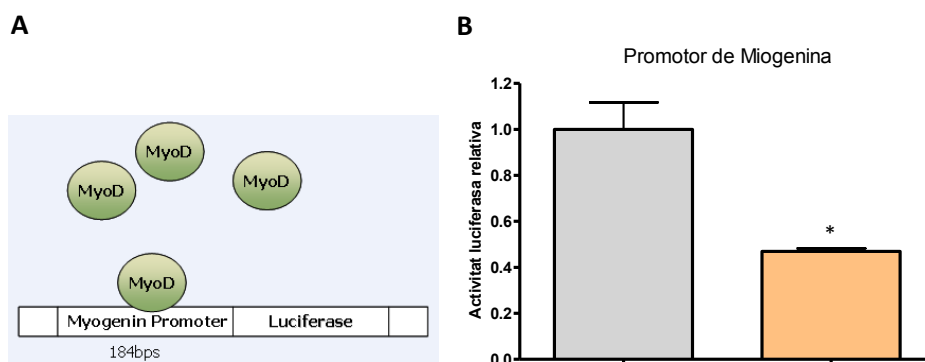


Figura 40. Determinació dels nivells d'activitat transcripcional d'un fragment del promotor de la Miogenina en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. (A) Representació esquemàtica d'un constructe que consisteix en un fragment de 184bp del promotor de la Miogenina i que a la vegada controla l'expressió de la Luciferasa. **(B)** Anàlisi per luminometria de l'activitat transcripcional d'un fragment del promotor de la Miogenina relativitzats a Renilla (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,001$ sobre el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

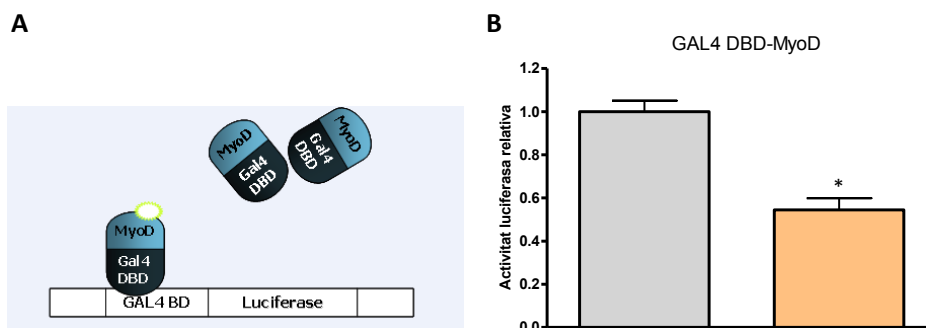


Figura 41. Determinació dels nivells d'activitat transcripcional de Gal4 DBD-MyoD en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. (A) Representació esquemàtica d'un constructe quimèric que consisteix en el domini d'unió Gal4 unit a MyoD i que a la vegada controla l'expressió de la luciferasa. **(B)** Anàlisi per luminometria de l'activitat transcripcional d'aquest constructe relativitzats a Renilla (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ sobre el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

4.1.4.4 Senyalització entre funció mitocondrial i diferenciació miogènica deguda a la deficiència de Opa1

4.1.4.4.1 Inhibidors de MyoD

Per tal de descobrir quina era la causa de la disminució en la activitat del promotor de Miogenina i del constructe quimèric amb MyoD en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1, es va mirar per *Real-Time PCR* l'expressió d'una sèrie de gens responsables d'inhibir MyoD, ja fos per via directa (Id, Twist, N-CoR, COUP-TFII, I-mfa, cJun i cdk4) o per via indirecta (Id, MyoR, I-mfa i ZEB) durant els estadis inicials de la diferenciació miogènica. Com es pot observar a la Figura 42A, no hi ha augment en cap d'aquests gens en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 però en canvi, sorprèn el fet que n'hi hagi dos que estiguin disminuïts. Aquest fet podria ser degut a un

intent per compensar els baixos nivells de MyoD per tal d'augmentar-ne la seva activitat. En canvi, si ens fixem en l'expressió d'aquests gens a Dia 1 (Figura 42B), no veiem cap canvi significatiu excepte en un miRNA per l'inhibidor I-mfa. No obstant, no es va tenir gaire en compte ja que a Dia 0 no vam observar cap canvi en aquest gen.

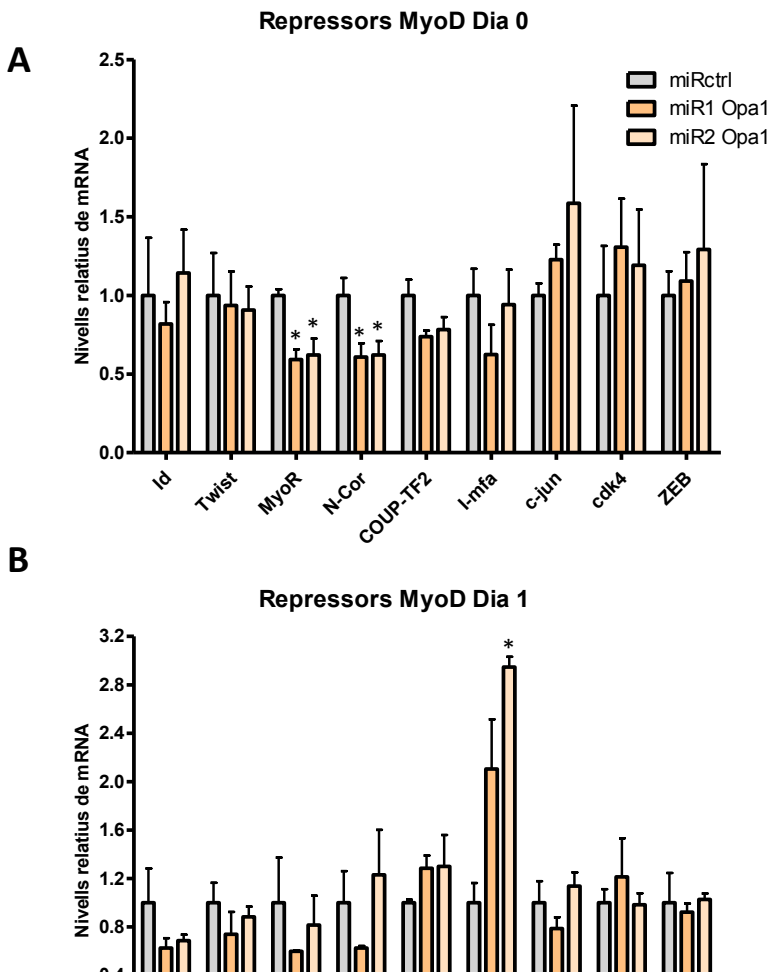


Figura 42. Determinació dels nivells de mRNA de *Id*, *Twist*, *MyoR*, *N-cor*, *COUP-TF2*, *I-mfa*, *c-jun*, *cdk4* i *ZEB* en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de *Opa1* a Dia 0 i 1. Anàlisi per *Real-Time PCR* dels nivells de diferents repressors de *MyoD* en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de *Opa1* de Dia 0 (A) i Dia 1 (B) relativitzats a *ARP* (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre el control obtingudes mitjançant una *t* d'Student amb dues cues de distribució.

4.1.4.4.2 Reguladors de la miogènesi: p38, ERK, JNK i NF- κ B

Seguint amb la idea de trobar quin era el mecanisme pel qual la pèrdua de funció de *Opa1* en cèl·lules C2C12 dona lloc a una menor diferenciació miogènica traduïda en una menor expressió i activitat d'alguns marcadors de miogènesi, es va decidir estudiar diferents cascades de senyalització que estan involucrades i són imprescindibles per a dur a terme una correcta diferenciació miogènica. Així doncs, es va començar provant amb p38, que està involucrada en el procés de diferenciació miogènica (Keren, Tamir, and Bengal 2006; Lluís et al. 2006; Perdiguero et al. 2007); ERK1/2, involucrat en la proliferació dels mioblasts (N. C. Jones et al. 2001); i JNK, on hi ha certa controvèrsia (Khurana and Dey 2004; Meriane et al. 2000). Així doncs, s'esperava observar algun tipus de canvi en la fosforilació de residus clau en alguna d'aquestes vies però no se'n va trobar cap (Figura 43 i 44).

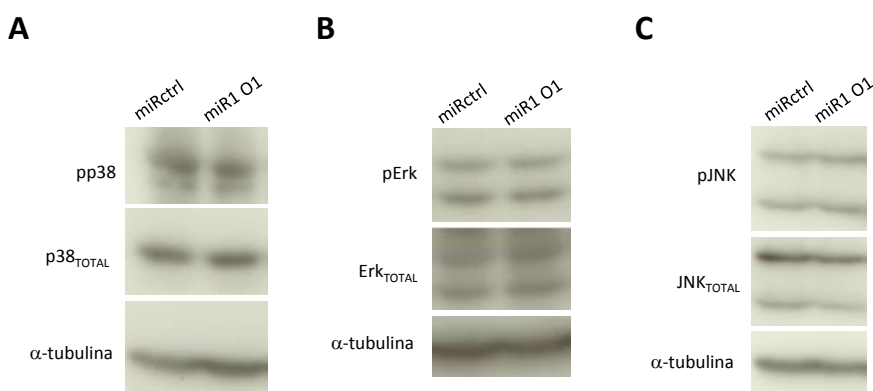


Figura 43. Determinació dels nivells de proteïna de p38, Erk i JNK en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Experiments representatius de l'anàlisi per *Western Blot* dels nivells de pp38 i p38_{TOTAL} (A), pErk i Erk_{TOTAL} (B) i pJNK i JNK_{TOTAL} (C) en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1.

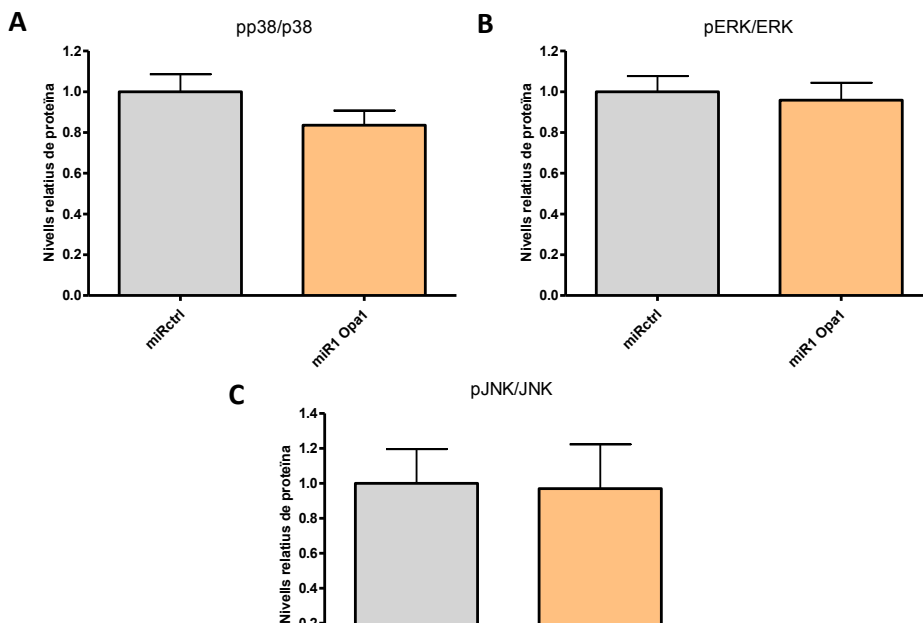


Figura 44. Determinació dels nivells relatius de proteïna de p38, Erk i JNK en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 6 experiments independents, obtinguts de l'anàlisi per densitometria dels nivells relatius de les proteïnes de pp38 i p38_{TOTAL} (A), pErk i Erk_{TOTAL} (B) i pJNK i JNK_{TOTAL} (C) i corregits per la α -tubulina en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1.

Un cop descartades les vies de senyalització plantejades anteriorment, es va decidir estudiar la via de NF- κ B, ja que és un regulador clau de la retirada del cicle cel·lular i de la diferenciació miogènica (Guttridge et al. 2000; Hayden and Ghosh 2008). Si ens fixem en la Figura 45 i 46, es pot observar que no es troben

diferències en la expressió de l'inhibidor $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ però si amb $\text{I}\kappa\text{B-}\beta$ tant a Dia 0 com a Dia 1, on veiem una completa degradació en mioblasts amb pèrdua de funció de Opa1, indicant un possible augment en l'activitat d'aquesta via. Així doncs i per tal de confirmar aquest resultat, es van realitzar experiments de cotransfecció amb un plasmidi $3\kappa\text{B}$, que conté 3 llocs $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (per RelA, RelB i cRel) i controla l'expressió del gen reporter luciferasa, i un plasmidi que conté la Renilla. D'aquesta manera, es va observar que l'activitat transcripcional de $3\kappa\text{B}$ estava augmentada fins a 3'5 cops en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 respecte els controls (Figura 47).

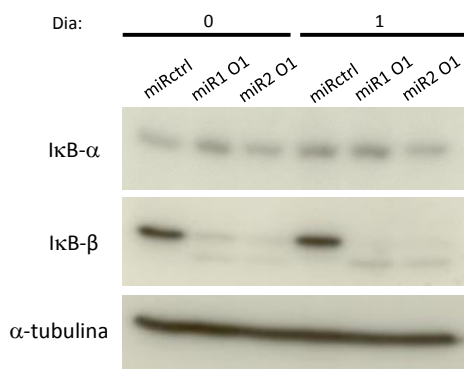


Figura 45. Determinació dels nivells de proteïna de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ i $\text{I}\kappa\text{B-}\beta$ en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 i Dia 1. Experiments representatius de l'anàlisi per *Western Blot* dels nivells de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ i $\text{I}\kappa\text{B-}\beta$ en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de $40\mu\text{g}$ de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1.

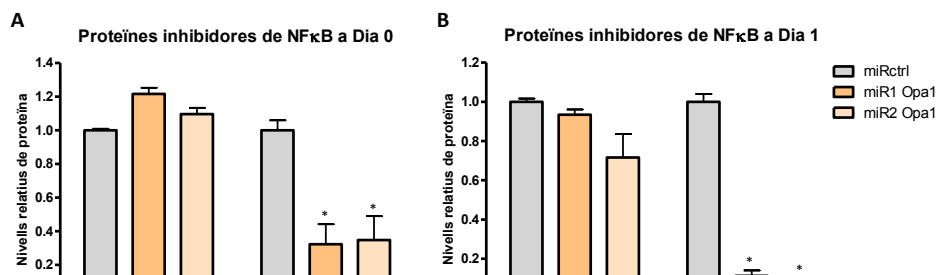


Figura 46. Determinació dels nivells relatius de proteïna de κB-α i κB-β en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 i Dia 1. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents, obtinguts de l'anàlisi per densitometria dels nivells relatius de les proteïnes κB-α i κB-β corregits per la α-tubulina de mioblasts C2C12 a Dia 0 (A) i Dia 1 (B) obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1. *mostra diferències estadísticament significatives amb p<0,05 sobre cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

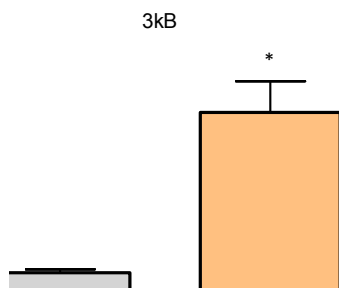


Figura 47. Determinació dels nivells d'activitat transcripcional del promotor de NFκB en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0. Anàlisi per luminometria de l'activitat transcripcional d'un fragment comú de RelA, RelB i cRel que anomenem 3kB per analitzar l'activitat transcripcional del promotor de NfκB relativitzats a Renilla (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb p<0,05 sobre el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

4.1.5 Efectes de l'ús d'antioxidants sobre la diferenciació miogènica afectada per la deficiència d'Opa1

Un cop evidenciat que els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 produïen uns nivells de peròxid d'hidrogen mitocondrial més elevats que en els mioblasts C2C12 control, es va pensar en la possibilitat de reduir aquests nivells mitjançant l'ús d'antioxidants específics per veure si realment eren la causa inicial de la menor diferenciació miogènica. Així doncs, inicialment es va provar el tractament puntual amb l'antioxidant NAC (N-Acetilcisteïna), un cop els mioblasts ja havien estat transduïts i abans que aquests comencessin el procés de diferenciació miogènica. La NAC és un principi actiu que produeix un augment dels dipòsits de glutatió, conferint una activitat antioxidant directe. No obstant, tot i que l'ús de la NAC en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 millorava la diferenciació miogènica, també millorava la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control (resultats no mostrats). A més, tot i que l'ús de la NAC en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 milloraven els nivells de la proteïna Cav3 (marcador tardà que indica una bona formació de miotubs), també els incrementava en els miotubs controls (Figura 48). De fet, es va fer un segon experiment augmentant les concentracions de NAC però no es va observar cap milloria (resultats no mostrats). A més, tot i que l'ús de la NAC reduïa els nivells de peròxid d'hidrogen en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1, també els reduïa en els mioblasts C2C12 control, mantenint les proporcions entre els mioblasts C2C12 control i els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 (Figura 49). Per tant, es va pensar que no era un antioxidant prou específic del peròxid d'hidrogen mitocondrial de cara a realitzar un rescat de funció.

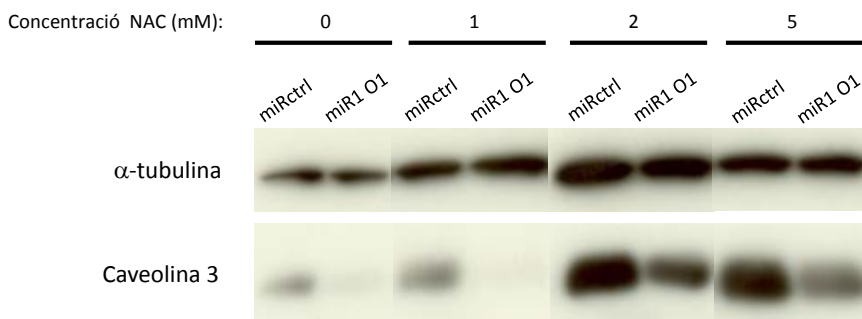


Figura 48. Determinació dels nivells de proteïna de Cav3 en miotubs C2C12 control i en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 amb o sense tractament de l'antioxidant NAC a Dia 4 de diferenciació. Anàlisi per *Western Blot* de la Cav3 en miotubs C2C12 obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 utilitzant diferents concentracions de l'antioxidant NAC, diferenciat a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Experiment únic, obtingut a partir de 40 μ g de proteïna provinents de lisats totals de miotubs C2C12

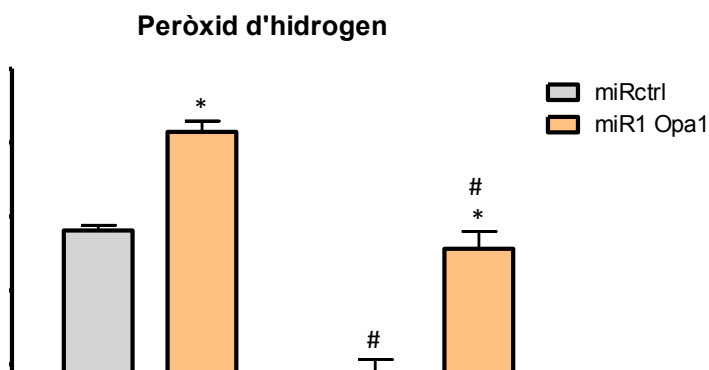


Figura 49. Determinació de la producció de peròxid d'hidrogen en lisats totals de mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 a Dia 0 amb o sense tractament amb NAC. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 juntament amb 0 o 5mM de l'antioxidant NAC, posteriorment lisats a Dia 0 i finalment analitzats per espectrofotometria a 560nm mitjançant l'ús de la sonda *Amplex Red*. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard. *mostra

diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte els seus controls, obtingudes mitjançant una t d'Student amb una cua de distribució. #mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte els NT, obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

Per una altra banda, els complexos de Salen de manganès EUK-134 i EUK-207 (Figura 50) són dos antioxidants específics que mimetitzen la superòxid dismutasa i la catalasa i es van utilitzar per veure si, reduint els nivells excessius de peròxid d'hidrogen, els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 recuperaven la correcta diferenciació miogènica. La diferència principal entre aquests dos complexos és que l'EUK-207 és un antioxidant de "segona generació", és a dir, és cíclic per augmentar la seva estabilitat (important sobretot per estudis *in vivo*).

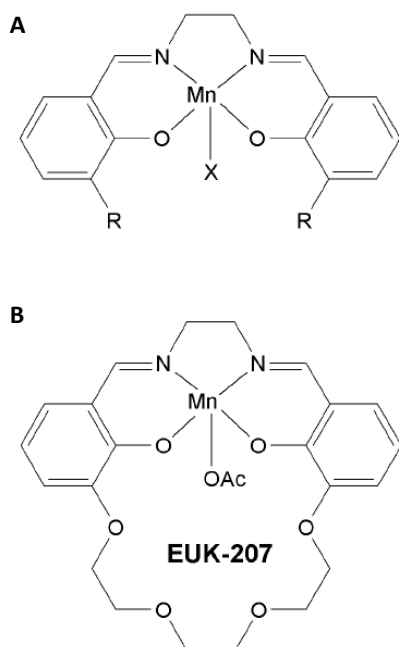


Figura 50. Estructura dels complexos de Salen de manganès EUK-134 i EUK-207. Ambdós antioxidants, EUK-134 (A) i EUK-207 (B), tenen activitats superòxid dismutasa (SOD) i catalasa, motiu pel qual es consideren mitoprotectors. EUK-207 és un complexe cíclic, on OAc = acetoxi; EUK-134 és un complexe no cíclic, on R = metoxi i X = acetoxi.

Inicialment, es va decidir utilitzar l'antioxidant EUK-207 durant l'estada al laboratori del Dr Orian Shirihai a Boston, MA. Com es pot observar, almenys a

nivell morfològic, l'acció de l'EUK-207 sobre mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 millora la diferenciació miogènica (Figura 52 i 53). Tot i això, aquesta millora no es tradueix en forma d'anàlisi de marcadors bioquímics tardans de diferenciació (Figura 54).

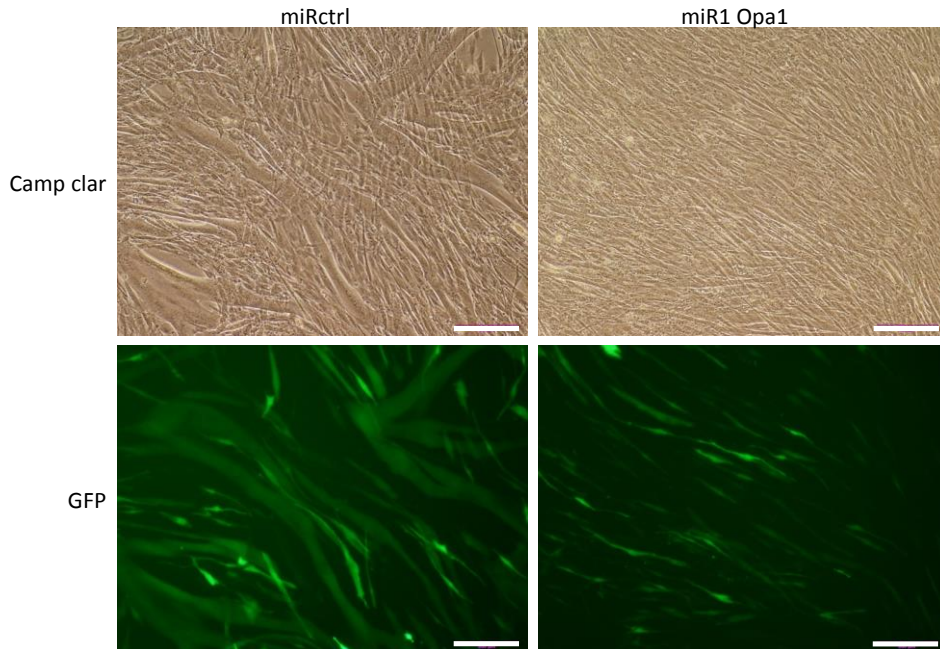


Figura 51. Morfologia de miotubs a Dia 4 de diferenciació obtinguts a partir de mioblasts C2C12 control i de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 sense l'ús de l'antioxidant EUK-207. Experiment representatiu de l'anàlisi morfològic de miotubs obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 sense l'ús de l'antioxidant EUK-207, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Barra d'escala 200µm.

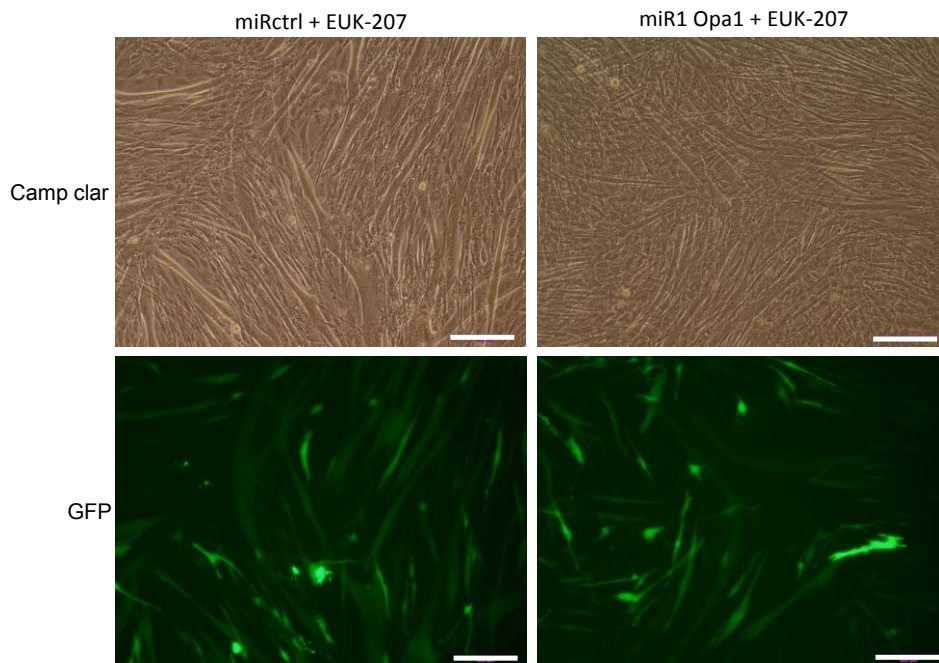


Figura 52. Morfologia de miotubs a Dia 4 de diferenciació obtinguts a partir de mioblasts C2C12 control i de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 mitjançant l'ús de l'antioxidant EUK-207. Experiment representatiu de l'anàlisi morfològic de miotubs obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 utilitzant 1µM de l'antioxidant EUK-207, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Barra d'escala 200µm.

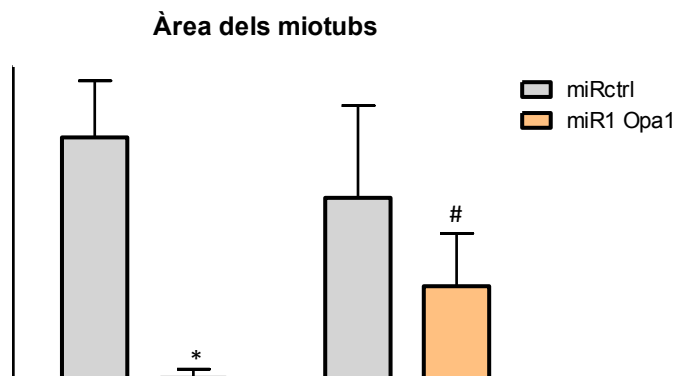


Figura 53. Determinació de l'àrea dels miotubs a Dia 4 obtinguts a partir de mioblasts C2C12 control o de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 amb o sense tractament de l'antioxidant EUK-207. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 2 experiments independents de miotubs obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 utilitzant 0 μ M (NT) o 1 μ M de l'antioxidant EUK-207, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,001$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució. #mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ respecte el miR1 Opa1 (NT) obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

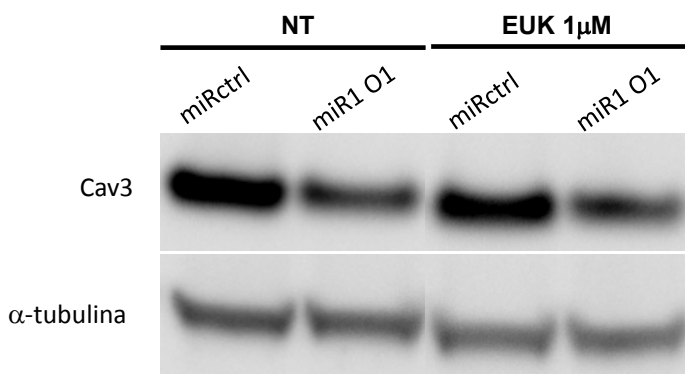


Figura 54. Determinació dels nivells de proteïna de Cav3 en miotubs C2C12 control i en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 amb o sense tractament de l'antioxidant EUK-207 a Dia 4 de diferenciació. Anàlisi per *Western Blot* de la Cav3 en miotubs C2C12 obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 utilitzant 0 μ M o 1 μ M de l'antioxidant EUK-207, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Experiment únic, obtingut a partir de 40 μ g de proteïna provinents de lisats totals de miotubs C2C12.

Tot i el gran potencial d'aquest antioxidant, no es va poder utilitzar per fer més experiments a Barcelona degut a temes de propietat industrial. Per tant, ens vam veure obligats a buscar un antioxidant de característiques similars per donar validesa als resultats mostrats anteriorment. Així doncs, es va decidir adquirir el EUK-134 (Cayman Chemical), compost semblant pels experiments que es volien realitzar però menys estable de cara a futurs experiments '*in vivo*'. Com es pot observar en la Figura 56, l'ús de l'EUK-134 sobre mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 millora a nivell morfològic la diferenciació miogènica, de manera similar a la observada utilitzant l'EUK-207.

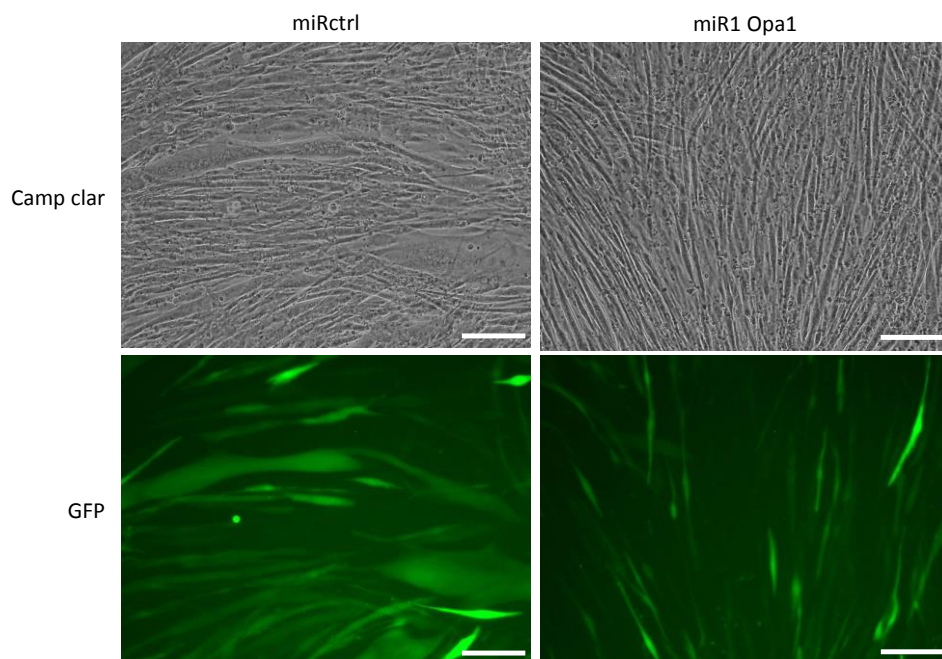


Figura 55. Morfologia observada en miotubs a Dia 4 de diferenciació obtinguts a partir de mioblasts C2C12 control i de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 sense l'ús de l'antioxidant EUK-134. Experiment representatiu de l'anàlisi morfològic de miotubs obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 sense l'ús de l'antioxidant EUK-134, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Barra d'escala 200µm

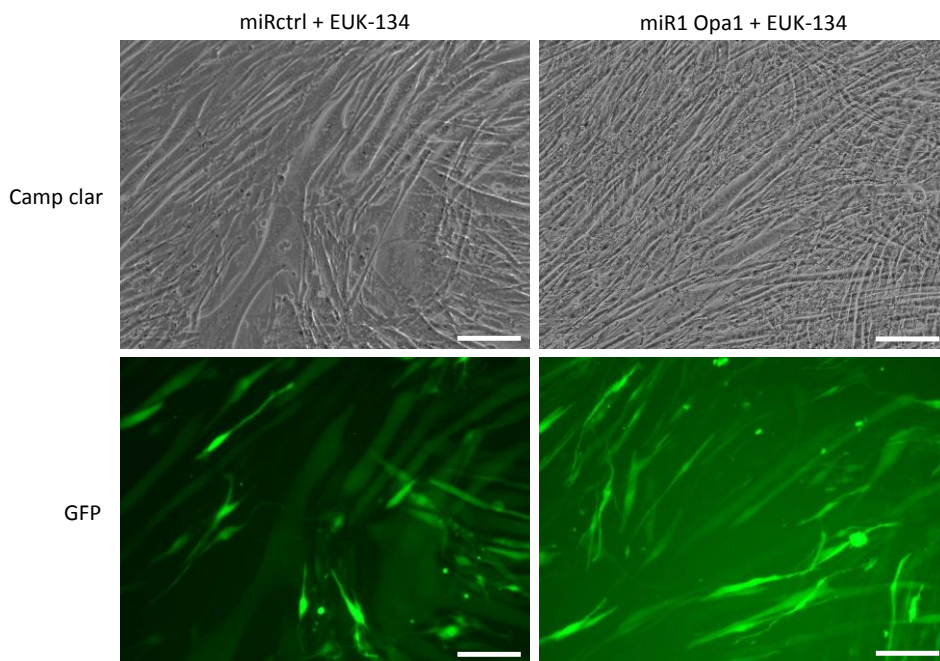


Figura 56. Morfologia observada en miotubs a Dia 4 de diferenciació obtinguts a partir de mioblasts C2C12 control i de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 mitjançant l'ús de l'antioxidant EUK-134. Experiment representatiu de l'anàlisi morfològic de miotubs obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 utilitzant $1\mu\text{M}$ de l'antioxidant EUK-134, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Barra d'escala $200\mu\text{m}$.

Tot seguit, es va decidir fer assaigs immunocitoquímics utilitzant com a anticòs la cadena pesada de la miosina embrionària (eMHC), per tal de quantificar en primer lloc el número de nuclis que tenien els miotubs C2C12 de Dia 4 amb pèrdua de funció de Opa1 en comparació amb els control i, en segon lloc, si aquests milloraven amb l'ús de l'antioxidant EUK-134 i en quin grau. Com es pot observar en la Figura 57 i en la posterior quantificació mitjançant la relació de fusió (Figura 58), la gran majoria de miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 tenen menys de 3 nuclis per miotub i s'observen molt pocs que tinguin

més de 4 nuclis per miotub, confirmant altre cop la gran alteració en la diferenciació miogènica. En canvi, si ens fixem en els miotubs C2C12 control, s'observa que la majoria tenen entre 4 i 12 nuclis per miotub, però també s'observen de més grans i de més petits.

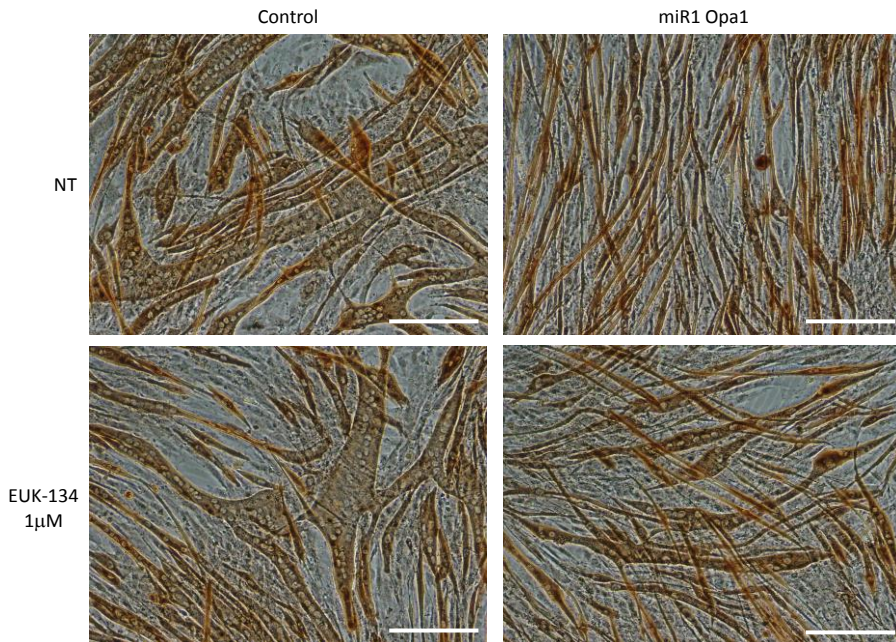


Figura 57. Immunocitoquímica per la eMHC en miotubs C2C12 control i en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 amb o sense tractament amb l'antioxidant EUK-134 a Dia 4 de diferenciació. Experiment representatiu de l'anàlisi morfològic de miotubs obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 utilitzant 0µM (NT) o 1µM de l'antioxidant EUK-134, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Barra d'escala 200µm.

Ratio de fusió

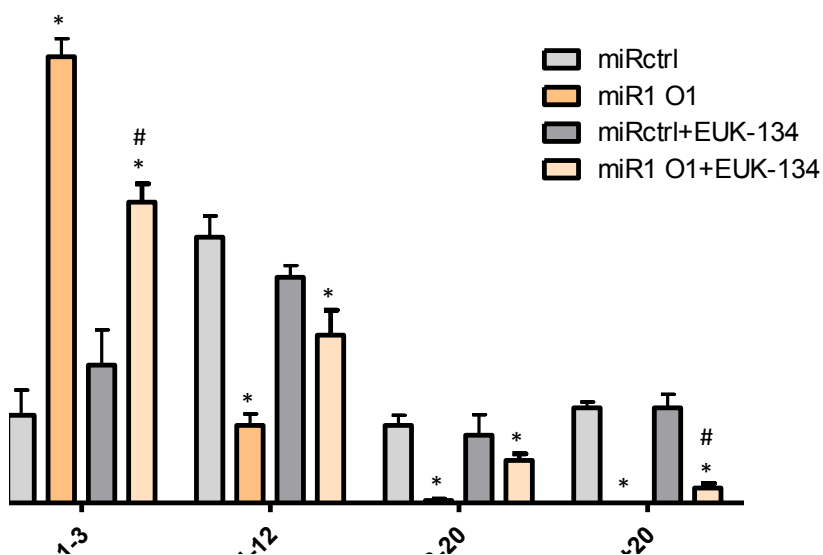


Figura 58. Determinació de la relació entre la fusió en miotubs C2C12 control i en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 amb o sense tractament de l'antioxidant EUK-134 a Dia 4 de diferenciació. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard d'un total de 200 miotubs provinents de 4 experiments independents obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 utilitzant 0 μ M o 1 μ M de l'antioxidant EUK-134, diferenciat a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució. #mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte el control+EUK-134 obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

En resum, aquests resultats mostren clarament que l'ús dels antioxidants EUK-134 i EUK-207 en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de la proteïna de fusió mitocondrial Opa1, recuperen la capacitat per formar miotubs, tot i que aquests no arriben a ser tan llargs i gruixuts com en el cas dels miotubs C2C12 control.

4.1.6 Generació, validació i fenotip de la repressió parcial de la proteïna Opa1 en múscul esquelètic de ratolí

A partir dels resultats observats en els mioblasts i miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1, es va decidir estudiar els efectes de la pèrdua de funció de Opa1 en un model de miogènesi *'in vivo'*. D'aquesta manera, es va utilitzar un model de regeneració muscular mitjançant la inducció d'una lesió produïda per la injecció intramuscular de cardiotoxina (CTX), una toxina procedent d'un verí de serp que degrada la massa muscular, a ratolins C57BL/6J de 12 setmanes d'edat. Transcorreguts dos dies des de la lesió muscular, les cèl·lules del sistema inflamatori han finalitzat la seva funció de degradació del teixit danyat, deixant pas a la proliferació de les cèl·lules satèl·lit. En aquest moment, es van inocular els adenovirus codificants de miRNA control o de Opa1, per tal de transduir el màxim nombre de cèl·lules satèl·lit proliferants. A partir d'aquí, es van prendre mostres a diferents temps (dia 9, 12 i 22 després de la lesió amb cardiotoxina) per avaluar el procés de regeneració muscular mitjançant tècniques histològiques (Figura 59). Prèviament a l'extracció de les diferents mostres, es va comprovar mitjançant l'IVIS (*'In vivo' Imaging System*) l'expressió de la GFP, ja que ens indicava si els miRNA s'estaven expressant en les cèl·lules del múscul gastrocnemi (Figura 60).

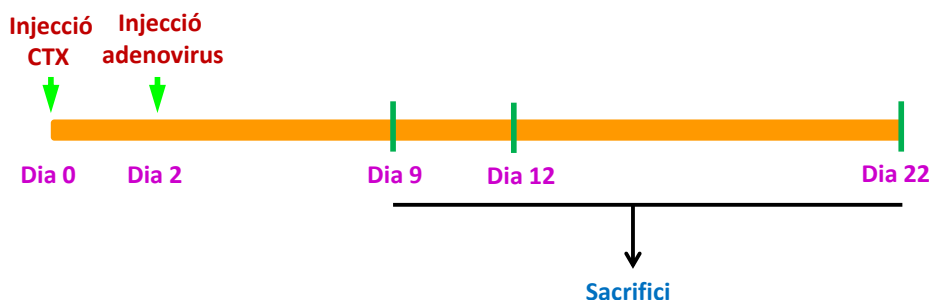


Figura 59. Representació esquemàtica del procés seguit per estudiar la regeneració muscular en gastrocnemius de ratolins control o amb pèrdua de funció de Opa1 de 3 mesos d'edat. Inicialment, s'indueix una lesió muscular (concretament al múscul gastrocnemi) produïda per la injecció intramuscular de cardiotoxina (CTX), un verí que degrada la massa muscular. Dos dies després, es fa una segona injecció intramuscular per tal de transduir aquests músculs amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1. Finalment, es sacrifiquen aquests ratolins a diferents dies (a 9, 12 i 22 post-injecció inicial de cardiotoxina) per tal d'extreure mostres de múscul gastrocnemi i estudiar el procés de regeneració.

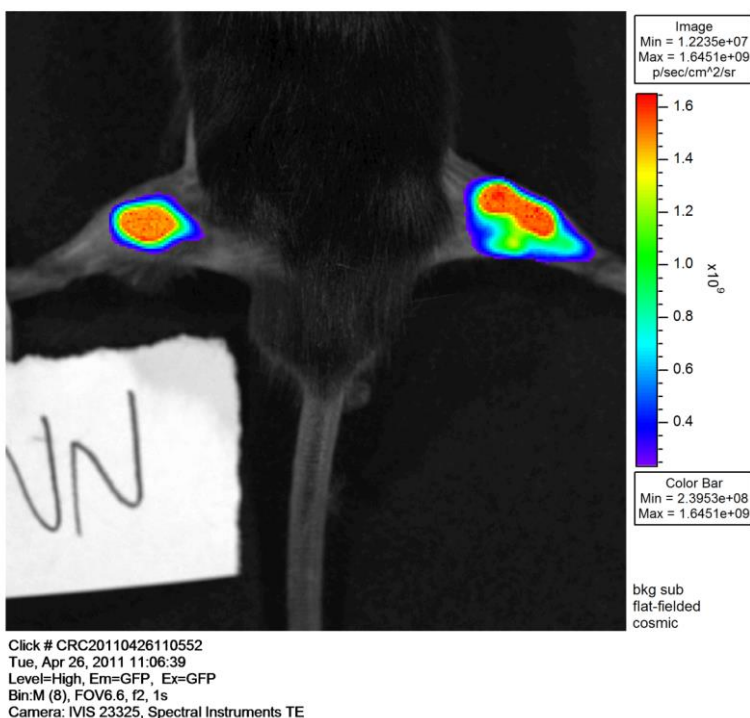


Figura 60. Comprovació de l'expressió de l'adenovirus control i de l'adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 en el múscul gastrocnemi de ratolins. Mitjançant l'IVIS es van obtenir imatges de ratolins a dia 9, 12 i 22 respecte la injecció inicial de cardiotoxina. La imatge es representativa de músculs gastrocnemius a dia 9 i el color indica la intensitat de fluorescència (el vermell significa màxima intensitat i el blau, mínima).

Mitjançant la tinció Hematoxilina-Eosina (H&E), s'ha pogut comprovar que els músculs de ratolins danyats per la CTX amb pèrdua de funció de Opa1 a dia 22 post-injecció (p.i) de la CTX no estan recuperats i que els ratolins control, en aquest mateix moment, segueixen un procés normal de recuperació, encara

que el període de regeneració encara no ha finalitzat del tot. De fet, en els ratolins danyats per la CTX amb pèrdua de funció d'Opa1 encara s'observen zones necròtiques i fibroses (Figura 61).

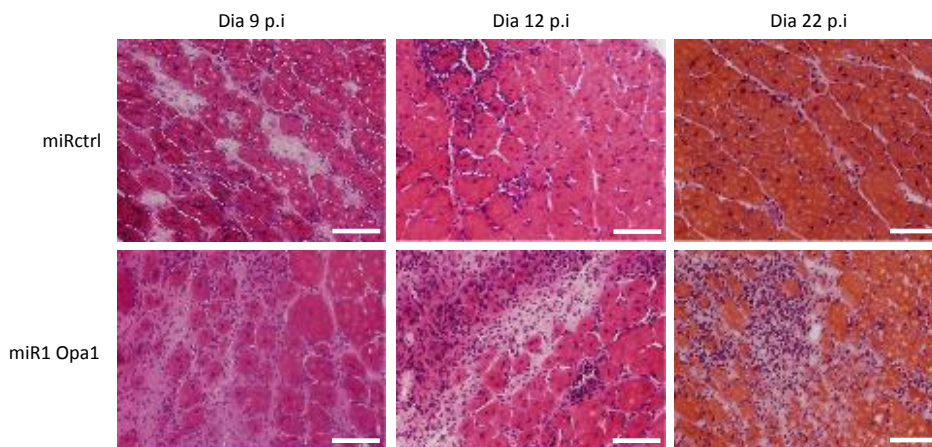


Figura 61. Tinció Hematoxilina-Eosina de múscul esquelètic de ratolins Wt danyats per la CTX i transduïts amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1. Experiment representatiu d'una tinció H&E de talls transversals de múscul gastrocnemi de ratolins de 3 mesos d'edat, danyats mitjançant l'ús de la CTX i transduïts posteriorment amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Opa1. Les mostres es van extreure a diferents dies després de la lesió inicial amb la CTX (a Dia 9, 12 i 22). Barra d'escala 100µm. Tinció realitzada per la Dra M^a Àngels Díaz.

4.1.7 Generació, validació i fenotip observat de la repressió total de la proteïna Opa1 en múscul esquelètic de ratolí

Amb els resultats preliminars obtinguts en cèl·lules i els posteriors amb la repressió parcial de Opa1 en múscul esquelètic de ratolí, es va decidir fer el ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic. Així doncs, es va demanar a KOMP (trans-NIH Knock-Out Mouse Project) 3 clons d'una modificació gènica realitzada en cèl·lules mare embrionàries per tal de generar el ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic mitjançant l'ajuda de la plataforma dirigida pel Dr Stephen Forrow. Només un clon va ser viable (C57BL/6N-Opa1tm1a

(KOMP)Wtsi; clon EPD0151-4-B11), essent l'utilitzat per la generació del ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic (Figura 62).

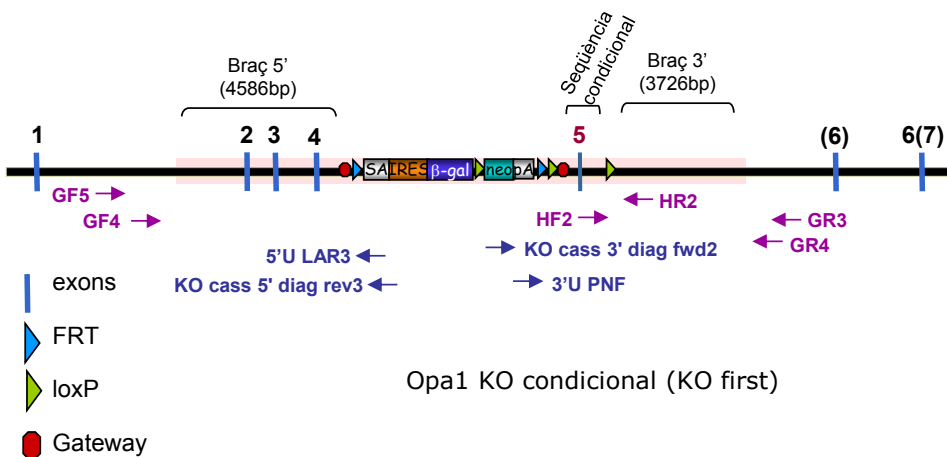


Figura 62. Representació esquemàtica de la modificació gènica realitzada en cèl·lules mare embrionàries per tal d'obtenir el ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic. El casset diana té un lloc acceptor d'*splicing* (SA), que permetrà a la seqüència β -gal unir-se al transcrit del gen. Hi ha una seqüència poliA just després de la seqüència de β -gal, que resultarà en un al·lel nul. El gen β -gal també permetrà una lectura de l'expressió del gen, pel que, a més d'actuar com a KO, l'al·lel també actuarà com a gen reporter de l'expressió. Tot i que aquesta modificació gènica no permet tenir un KO condicional directament, ja que l'al·lel en si genera un KO total, posteriorment pot general un KO condicional.

Com es pot observar en la Figura 62, la modificació gènica s'anomena KO first degut a que l'al·lel genera un KO total. No obstant i com es mostrarà posteriorment, es pot convertir en un al·lel condicional si s'eliminen les dues seqüències Frt mitjançant l'expressió de la Flp.

Així doncs, el primer pas va ser el cribatge mitjançant PCR per assegurar-nos que no hi hagués cap problema en el disseny del constructe i comprovar la presència de les seqüències loxP (Figura 63). Com es pot observar, tot estava correcte, tot i que les PCR on s'havien d'amplificar fragments grans de DNA no van sortir.

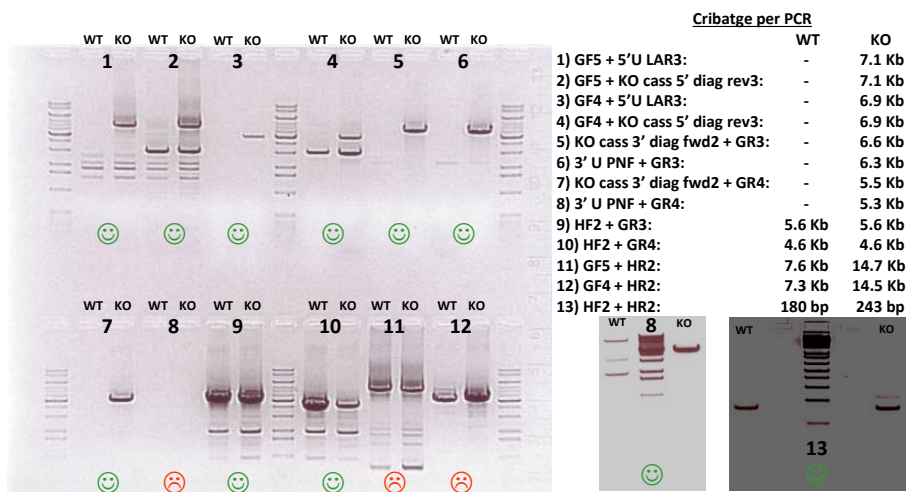


Figura 63. Comprovació mitjançant PCR que tots els elements de la modificació gènica de Opa1 estan en el lloc adequat. Mitjançant l'ús d'una sèrie de primers es va poder comprovar mitjançant PCR la presència dels diferents elements introduïts en la seqüència gènica de Opa1 en el lloc adequat.

A partir d'aquí, es van cultivar aquestes cèl·lules per tal de procedir a la microinjecció d'unes 15 cèl·lules en blastòcits de 3 dies i mig procedents de ratolins Balb/c. Posteriorment, els blastòcits que han tingut èxit en la microinjecció, es van reimplantar en l'oviducte de ratolines *foster* pseudo-gestants CD1, deixant que la gestació succeís. Finalment, es van seleccionar dos quimeres, seleccionades per presentar el 90% del pelatge esperat, per aleshores creuar-les amb ratolins Wt C5/B6/j per comprovar la transmissió i establir la línia.

Opa1 K:KO k:wild type C:condicional
 Flp F: flp1 f:wild type
 Cre R:Cre r:wild type

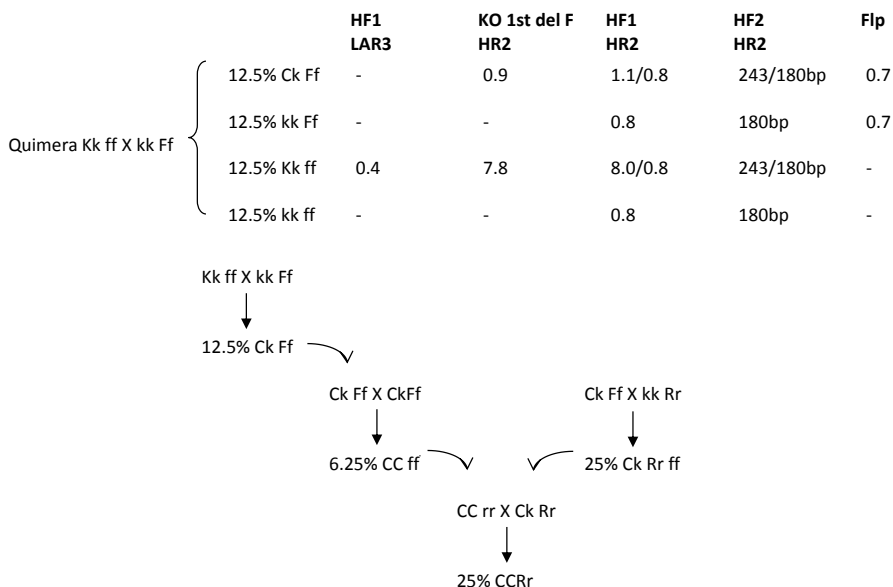


Figura 64. Representació esquemàtica de la estratègia utilitzada per aconseguir el ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic a partir de la ratolina quimera. Es mostren les diferents PCR a realitzar per diferenciar els diferents genotips que es poden obtenir i els diferents creuaments a realitzar fins a obtenir el ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic a partir d'una ratolina quimera.

Com s'ha comentat abans, per a obtenir el ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic és necessari, en primer lloc, crear aquestes quimeres amb un ratolí que expressi la Flp per tal d'eliminar les seqüències FRT i convertir l'al·lel KO total en un al·lel condicional per, posteriorment, creuar-lo amb un ratolí que expressi la Cre (en aquest cas, sota el promotor de la Miogenina i l'enhancer MEF2C) per a obtenir el ratolí desitjat (Figura 64 i 65).

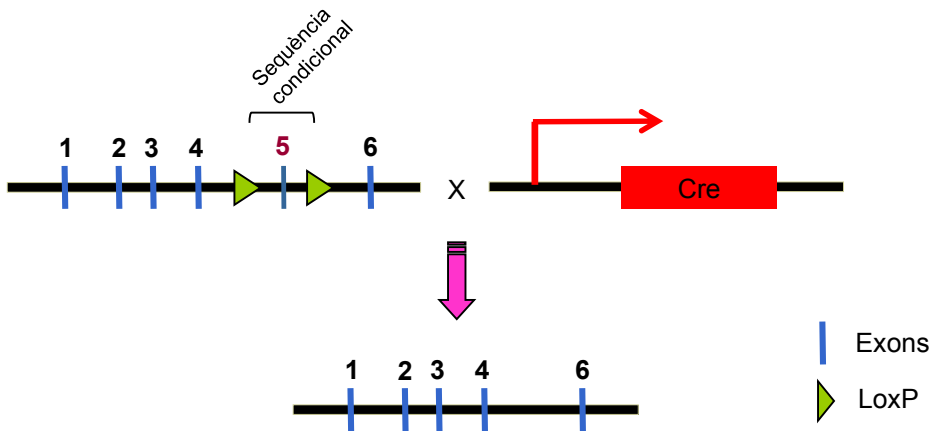


Figura 65. Representació esquemàtica de la estratègia final utilitzada per aconseguir el ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic. Es mostra una part de la estructura gènica de Opa1, mostrant únicament 6 exons i els corresponents 5 introns. Les seqüències loxP estan insertades en els introns 4 i 5 per tal que, en creuar-ho amb la recombinasa Cre (que en aquest cas, s'expressa sota el control del promotor de la Miogenina i l'enhancer MEF2C), s'escindeixi l'exó 5, eliminant d'aquesta manera totes les isoformes possibles de Opa1 específicament en múscul esquelètic de ratolí.

Un cop obtinguts els ratolins, es van dur a terme uns *Western Blots* per comprovar que realment es tractava d'un KO de la proteïna Opa1 específic de múscul esquelètic. Així doncs, com es pot observar a la Figura 66, no hi ha dubte de la validesa de la estratègia utilitzada.

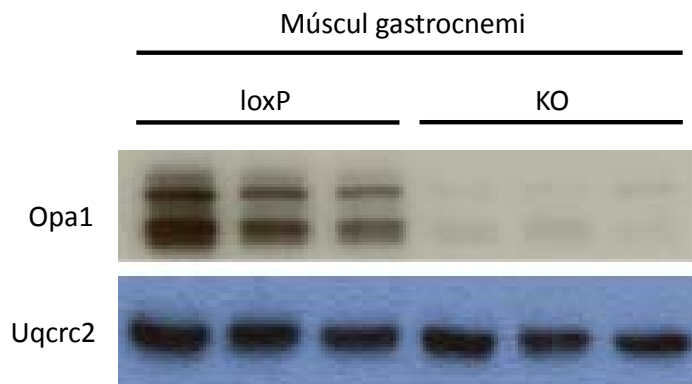


Figura 66. Determinació dels nivells de proteïna de Opa1 en ratolins control (loxP) i en ratolins Opa1 KO específics de múscul esquelètic (Opa1 KO). Experiment representatiu de l'anàlisi per *Western Blot* dels nivells de Opa1 en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents d'homogenat de teixit gastrocnemi de ratolins loxP i Opa1 KO. *Western Blot* realitzat per la Dra M^a Àngels Díaz.

A més, a nivell fenotípic es van observar unes diferències molt marcades entre ratolins loxP i KO, tal i com es pot veure en la Figura 67 i 68. D'aquesta manera, es veu clarament que aquests ratolins KO de la proteïna Opa1 específics de múscul esquelètic presenten un menor tamany (Figura 67), a part d'altres característiques evidents, com la presència de quifosi (Figura 68A) i cataractes (Figura 68B), si es compara amb els ratolins loxP.



Figura 67. Fenotip observat en els ratolins loxP i Opa1 KO. Imatges representatives del fenotip observat en ratolins loxP i Opa1 KO a 9 setmanes d'edat.

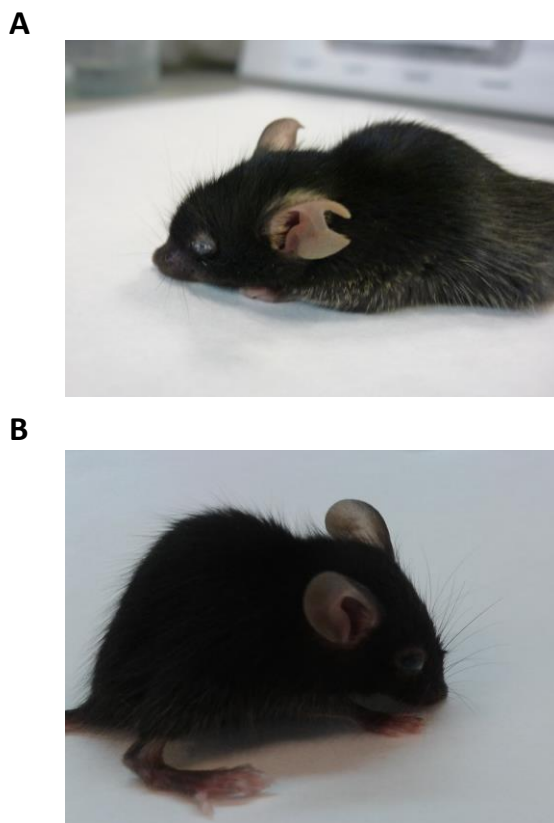


Figura 68. Fenotip observat en els ratolins Opa1 KO. Imatges representatives del fenotip observat en ratolins Opa1 KO a 12 setmanes d'edat, on es pot observar la presència de cataractes (A i B), quifosi (A i B) i problemes de suport muscular (B).

4.2 Mfn1

4.2.1 Generació i validació dels adenovirus recombinants. Model utilitzat

Per tal d'estudiar el rol de la proteïna Mfn1, es va decidir modular la seva activitat mitjançant la construcció de dos vectors adenovirals amb 2 miRNAs específics contra la seqüència de Mfn1 murina (anomenats miR1 Mfn1 (ó miR1

M1) i miR2 Mfn1 (ó miR2 M1)), tal i com s'ha fet per la proteïna Opa1. Així doncs, es va utilitzar la tecnologia recombinatòria de *Gateway* (Figura 10 i 11), per tal de bloquejar la seva expressió i disminuir al màxim els seus nivells proteics. Un cop obtinguts aquests vectors, es van produir els adenovirus.

Així doncs, per estudiar aquesta proteïna durant la miogènesi, es va decidir utilitzar com a model cel·lular les cèl·lules C2C12, que deriven de cèl·lules satèl·lit de múscul esquelètic de ratolí. Es van infectar mioblasts amb els adenovirus generats 48 hores abans de Dia 0 (inici del procés de diferenciació) per assegurar-nos que ja haguéssim alterat la dinàmica mitocondrial abans d'activar tota la maquinària de diferenciació cel·lular.

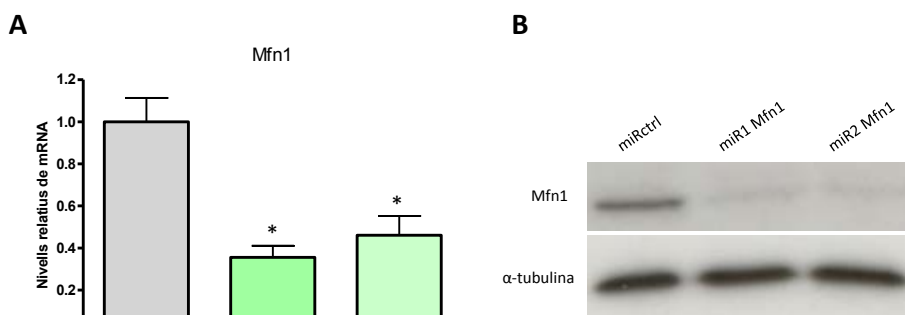


Figura 69. Determinació dels nivells de mRNA i de proteïna de Mfn1 en miotubs C2C12 control i en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. (A) Anàlisi per *Real-Time PCR* dels nivells de Mfn1 relativitzats a ARP (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 6 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ sobre el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució. **(B)** Experiment representatiu de l'anàlisi per *Western Blot* dels nivells de Mfn1 en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 i diferenciat fins a Dia 4.

Per tal de demostrar la validesa de la eina utilitzada, es van mesurar els nivells de mRNA i proteïna en miotubs de Dia 4 de diferenciació obtinguts a partir de la diferenciació de mioblasts C2C12 control o de mioblasts amb pèrdua de funció de Mfn1 per *Real-Time PCR* (Figura 69A) i *Western Blot* (Figura 69B). Tant a nivell de mRNA com de proteïna es veu una reducció dels nivells d'expressió en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 pròxima al 65% en mRNA i del 75% en proteïna respecte als miotubs C2C12 control.

4.2.2 Efectes de la deficiència de Mfn1 sobre la morfologia i la taxa de fusió mitocondrial en cèl·lules C2C12

Amb la finalitat de validar si aquesta disminució en l'expressió de Mfn1 afectava a la dinàmica mitocondrial, es va analitzar per microscòpia confocal la morfologia mitocondrial, obtenint diferents imatges (Figura 70) i realitzant experiments de "*time-lapse*" (veure CD adjunt) en mioblasts C2C12 mtDsRed (fluoròfor vermell que marca específicament a les mitocòndries) a Dia 0 transduïts amb els adenovirus generats. D'aquesta manera, els mioblasts C2C12 mtDsRed amb pèrdua de funció de Mfn1 mostraven una fragmentació generalitzada de la xarxa mitocondrial, cosa que no es va observar en mioblasts C2C12 mtDsRed control, on predominava una xarxa mitocondrial interconnectada.

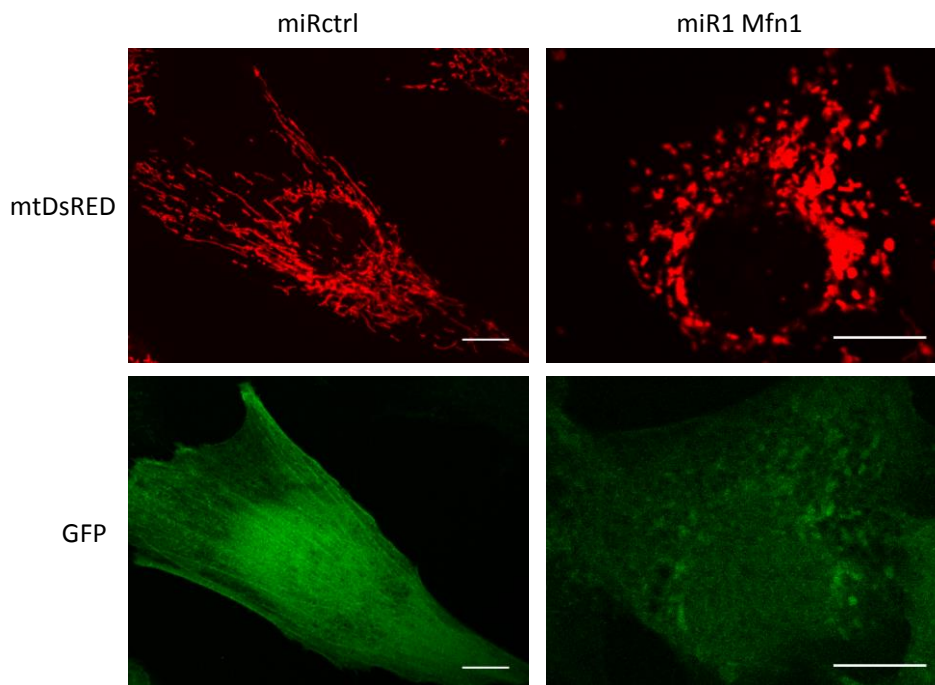


Figura 70. Morfologia mitocondrial observada en mioblasts C2C12 mtDsRed control i en mioblasts C2C12 mtDsRed amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Mioblasts C2C12 mtDsRed van ser transduïts 48h amb el miRctrl o el miR1 Mfn1 abans de ser analitzats per microscòpia confocal *'in vivo'*. Les imatges són representatives de 5 experiments independents. Barra d'escala 10 μ m.

No obstant, mitjançant aquests vídeos no va ser possible confirmar si aquestes mitocòndries amb pèrdua de funció de Mfn1 fusionaven menys o no, ja que no es disposava de tots els camps Z com per fer una visió tridimensional. Per tant, es va decidir utilitzar la tècnica del fotomarcatge d'una única mitocòndria (o grup de mitocòndries) dins d'una cèl·lula viva per fotoconversió de la proteïna GFP fotoactivable (mtPA-GFP) per avaluar la forma, la taxa de fusió mitocondrial i el moviment de la xarxa mitocondrial en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de la proteïna de fusió Mfn1³. D'aquesta manera, vam poder

³ Per a poder realitzar aquest experiment, es van redissenyar i produir nous adenovirus control i adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 per eliminar la GFP, ja que sinó no s'hauria pogut

monitoritzar la taxa de fusió de les mitocòndries al llarg del temps mitjançant la dilució de la GFP (Figura 14 i 71)

Anteriorment, s'ha comentat com és el perfil normal de fusió mitocondrial en mioblasts C2C12 control (Figura 14). En quan a la fusió mitocondrial en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1, s'observa que aquestes mitocòndries són incapaces de fusionar, ja que no tenen una de les proteïnes clau del procés de fusió de la membrana mitocondrial externa, és a dir, Mfn1. De fet, s'extreu encara més informació d'aquest experiment, ja que ens suggereix que Mfn2 per si sola, no és capaç de compensar la deficiència de Mfn1 per dur a terme la fusió mitocondrial de la membrana mitocondrial externa. D'aquesta manera, observem que no hi ha pràcticament pèrdua d'intensitat de la GFP que, als 30 minuts de la fotoactivació inicial, només és del 11% (Figura 72).

utilitzar el plasmidi que conté la mtPA-GFP. No obstant, els miRNA que contenen són exactament els mateixos que els utilitzats en els adenovirus amb GFP, emprats per la majoria d'experiments.

Cèl·lula muscular amb pèrdua de funció de Mfn1

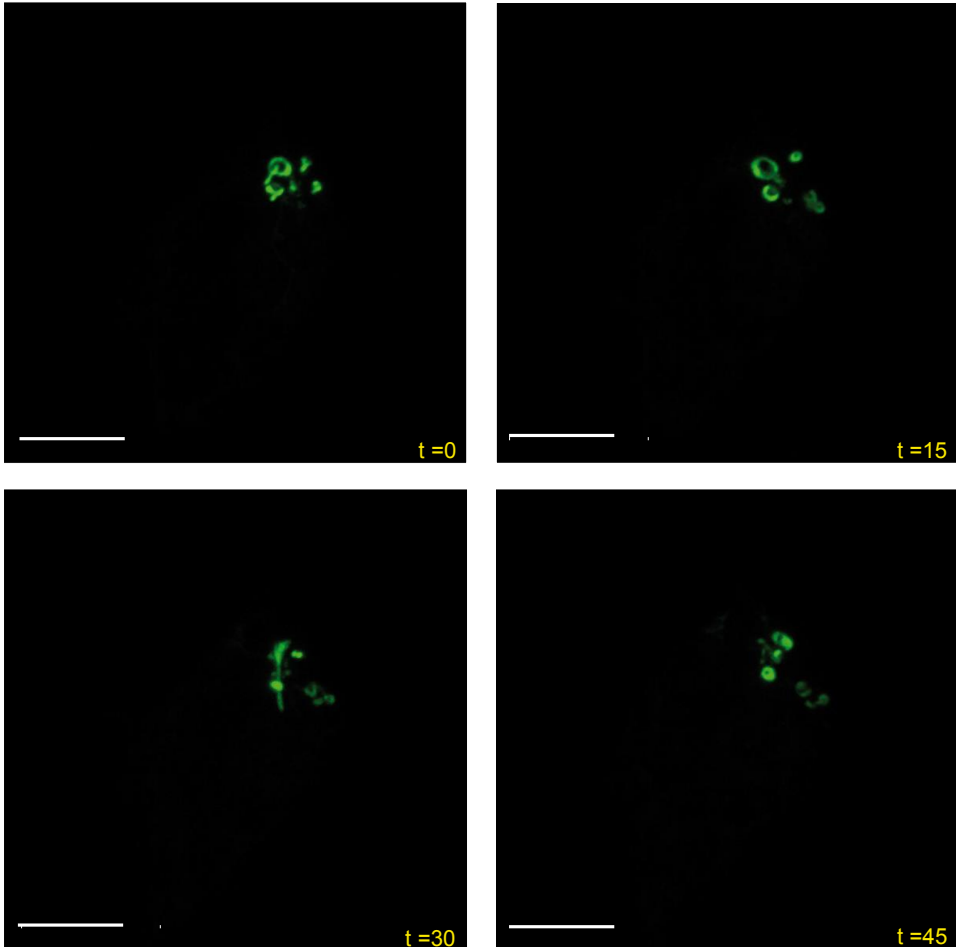


Figura 71. Assaig de fusió mitocondrial en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 i transfectats 24h abans de Dia 0 amb 1 μ g de plasmidi que conté la mtPA-GFP per posteriorment ser analitzats a Dia 0 per microscòpia confocal. Experiment representatiu de la fusió mitocondrial avaluada mitjançant la dilució de la GFP al llarg de 45 minuts a partir de la fotoconversió d'una única mitocondria fotomarcada. Barra d'escala 10 μ m.

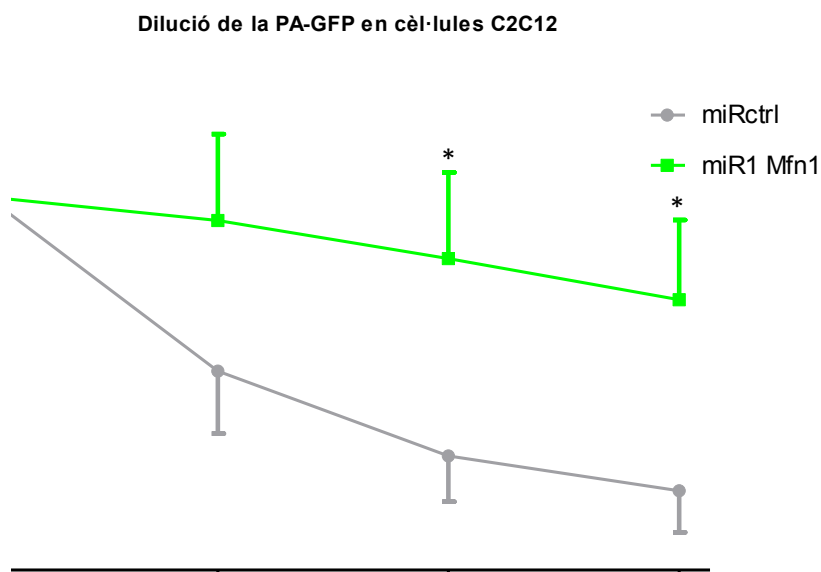


Figura 72. Quantificació de la fusió mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. Estimació de la fusió mitocondrial mitjançant la dilució de la GFP en mioblasts C2C12 control (línia gris) o amb pèrdua de funció de Mfn1 (línia verda). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard d'un total de 30 mioblasts per condició, estudiats al llarg de 10 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

4.2.3 Efectes de la deficiència de Mfn1 sobre la funció mitocondrial

4.2.3.1 Abundància mitocondrial

Per comprovar si la pèrdua de funció de Mfn1 alterava la quantitat de mitocondries en mioblasts C2C12, es va quantificar el DNA mitocondrial (mtDNA) mitjançant *Real-Time PCR*. Així doncs, utilitzant 'primers' específics, es van amplificar els gens Cox2 (subunitat II del complex IV) i SdhA (subunitat A del complex II), codificats pel genoma mitocondrial i nuclear, respectivament.

Tot i les dificultats per reproduir aquest experiment en concret i que no hi havia diferències estadísticament significatives, si que es va observar una lleugera tendència a que els mioblasts amb pèrdua de funció de Mfn1 tinguessin més quantitat de mitocondries (Figura 73).

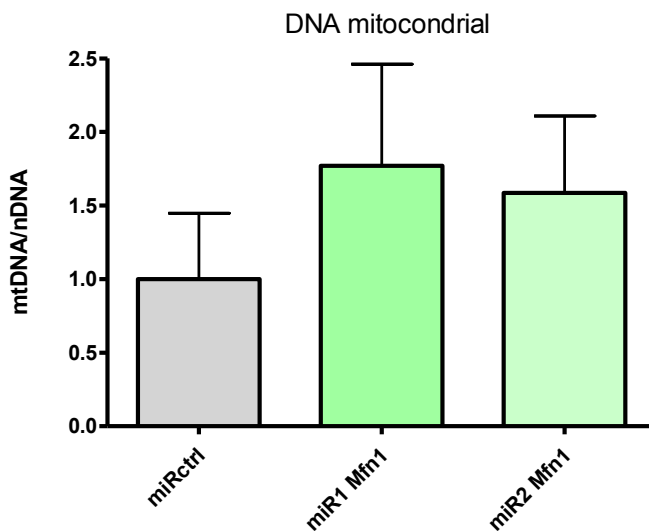


Figura 73. Determinació dels nivells de DNA mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Anàlisi per *Real-Time PCR* dels nivells de mtDNA relativitzats al nDNA mitjançant la utilització dels 'primers' específics Cox2 (subunitat II del complex IV pel mtDNA) i SdhA (subunitat A del complex II pel nDNA). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents.

4.2.3.2 Potencial de membrana mitocondrial

Posteriorment, es va mesurar el potencial de membrana mitocondrial mitjançant el marcatge amb el colorant tetrametil rodamina metil ester (TMRM) amb i sense la utilització del CCCP per corregir els valors obtinguts. La disminució de l'expressió de Mfn1 va lligada amb una caiguda prou marcada

(entre un 20 i un 25%) en el potencial de membrana mitocondrial, indicant certa disfunció en les mitocòndries (Figura 74).

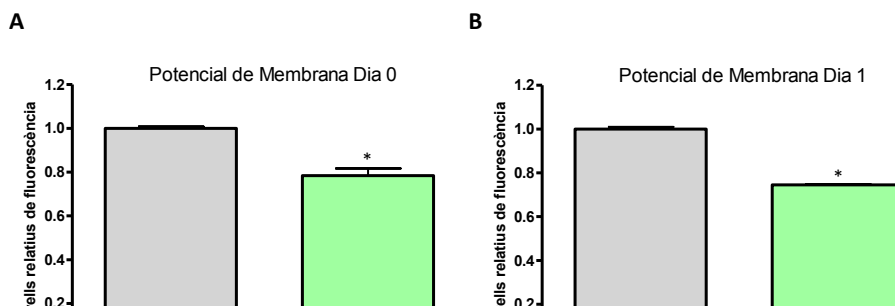


Figura 74. Determinació del potencial de membrana mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 i Dia 1. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 i analitzats per citometria de flux mesurant els nivells d'intensitat de fluorescència obtinguts mitjançant el colorant TMRM. Els valors es van obtenir restant els valors obtinguts obtinguts amb el colorant TMRM amb els obtinguts emprant el TMRM+CCCP en mioblasts C2C12 control o amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 (**A**) i Dia 1 (**B**). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,001$ obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

Per una altra banda, es va decidir mesurar el potencial de membrana mitocondrial en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 i en el seu control respectiu, el miRctrl (5x), per comparar aquesta proteïna amb les altres proteïnes involucrades en la fusió mitocondrial. Per a realitzar els experiments, es van utilitzar uns adenovirus recombinants que van ser dissenyats i produïts pel Dr Marc Liesa mitjançant la tecnologia recombinatòria de *Gateway*, i la diferència més destacada respecte als de Opa1 i Mfn1, és que tenen 5 miRNA contra Mfn2 enlloc de dos com és el cas de Opa1 i Mfn1.

Així doncs, i com és el cas de Opa1 i Mn1, la disminució de l'expressió de Mfn2 va lligada amb una caiguda (entre un 15 i un 20%) en el potencial de membrana mitocondrial, indicant una certa disfunció en les mitocòndries (Figura 75), encara que no tant marcada com és el cas de Opa1 o Mfn1.

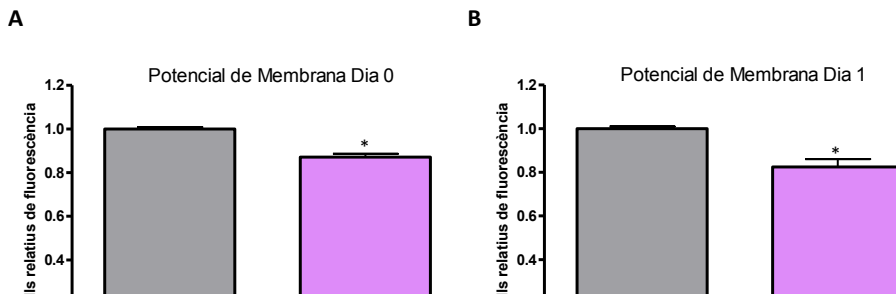


Figura 75. Determinació del potencial de membrana mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 a Dia 0 i Dia 1. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb cinc miRNA contra Mfn2 i analitzats per citometria de flux mesurant els nivells d'intensitat de fluorescència obtinguts mitjançant el colorant TMRM. Els valors es van obtenir restant els valors obtinguts emprant el TMRM+CCCP en mioblasts C2C12 control o amb pèrdua de funció de Mfn2 a Dia 0 (**A**) i Dia 1 (**B**). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

4.2.3.3 Expressió d'algunes subunitats dels complexos de la cadena respiratòria

Per avaluar els efectes de la pèrdua de funció de Mfn1 sobre la cadena respiratòria en cèl·lules C2C12, es va decidir analitzar l'expressió a nivell de proteïna d'algunes subunitats dels diferents complexos que en formen part. Així doncs, es van analitzar per *Western Blot* els nivells de les subunitats Ndufa9, SdhA, *Subunit core 1*, Cox4 i Atp5a dels complexos I, II, III, IV i V,

respectivament. Com es pot observar a Dia 0 i a Dia 1 de diferenciació, no hi ha canvis molt destacables en línies generals excepte per les subunitats dels complexos I i V a Dia 1, amb una caiguda prou significativa en els nivells d'expressió d'aquestes subunitats en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 i que es va mantenir al llarg de la miogènesi (Figura 76 i 77), encara que no tant marcada com en el cas de Opa1. Un cop aquests mioblasts van diferenciar a miotubs, es va observar que els miotubs de Dia 4 amb pèrdua de funció de Mfn1 mostraven també una caiguda destacable dels nivells proteics de les subunitats dels complexos III i IV, a part de les mencionades anteriorment (Figura 76 i 77). Aquest fet podria ser degut al simple fet que els miotubs no es formen correctament.

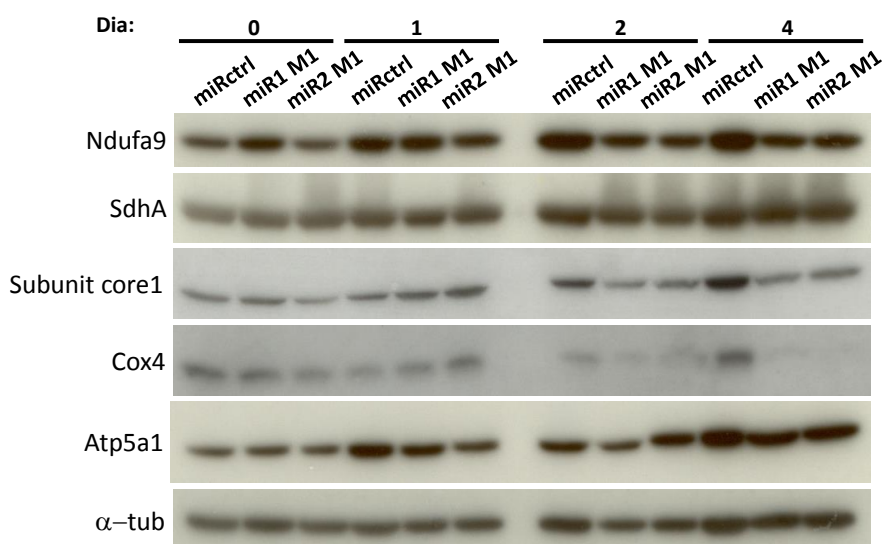


Figura 76. Determinació dels nivells de proteïna d'algunes subunitats dels diferents complexos de la cadena respiratòria durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control i en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. Experiment representatiu de l'anàlisi per *Western Blot* de Ndufa9 (complex 1), SdhA (complex II), *Subunit core1* (complex III), Cox4 (complex IV) i Atp5a1 (complex V) a Dia 0, 1, 2 i 4 en cèl·lules C2C12 transduïdes 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 (miR1 i miR2) i diferenciades a partir d'aleshores fins a Dia 4.

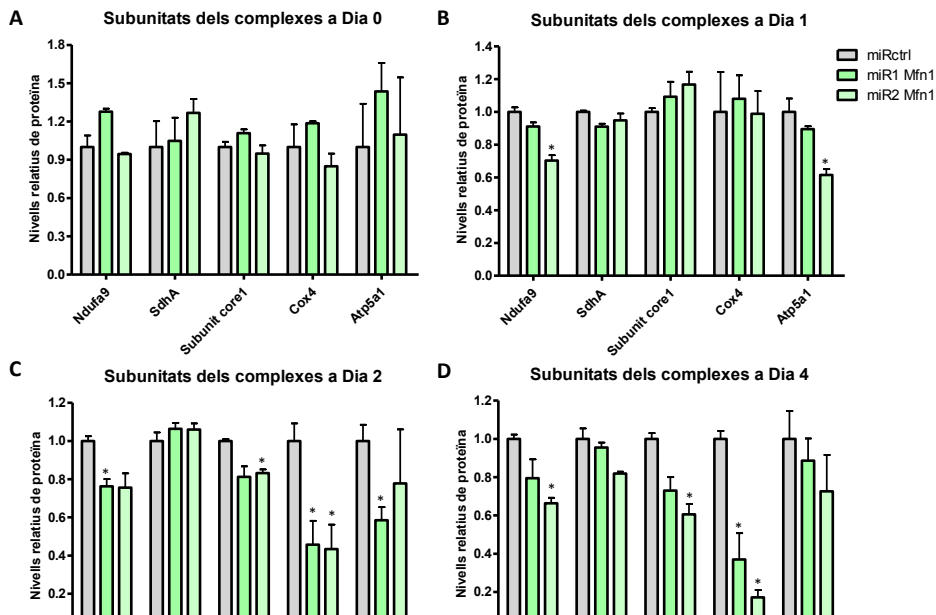


Figura 77. Determinació dels nivells relatius de proteïna d’algunes subunitats dels diferents complexos de la cadena respiratòria durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control i en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. El gràfic mostra la mitjana i l’error estàndard de 3 experiments independents, obtinguts de l’anàlisi per densitometria dels nivells relatius de les proteïnes Ndufa9 (complex 1), SdhA (complex II), *Subunit core1* (complex III), Cox4 (complex IV) i Atp5a1 (complex V) corregits per la α -tubulina a Dia 0 (A), Dia 1 (B), Dia 2 (C) i Dia 4 (D) en cèl·lules C2C12 transduïdes 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 (miR1 i miR2) i diferenciades a partir d’aleshores fins a Dia 4. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre cada control obtingudes mitjançant una t d’Student amb una cua de distribució.

4.2.3.4 Taxa del consum d’oxigen i activitat glicolítica

Per analitzar l’impacte de la disminució en la expressió de Mfn1 sobre el metabolisme energètic cel·lular, es van dur a terme experiments de respirometria. A continuació, es mostra un exemple d’un experiment (Figura 78).

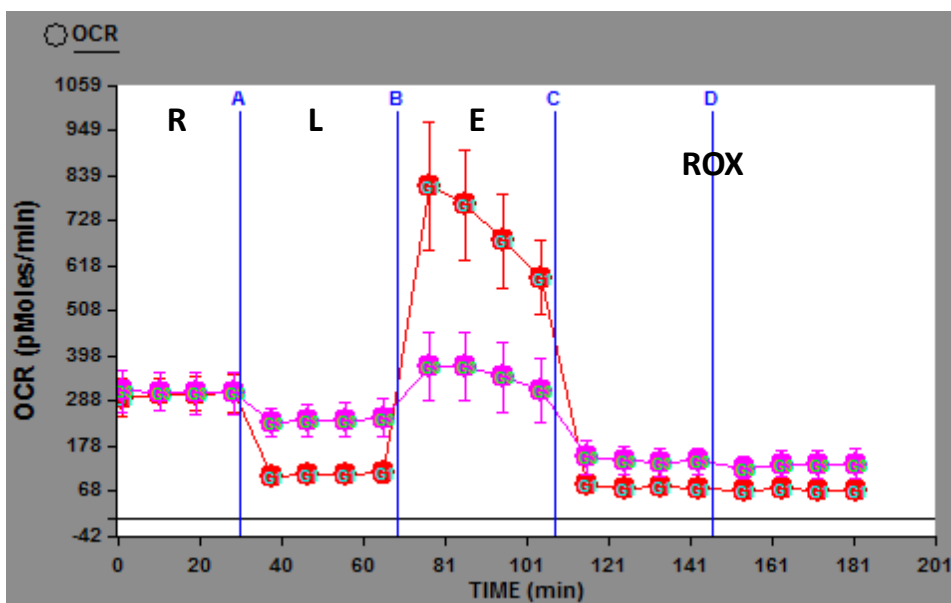


Figura 78. Assaig de respirometria per mesurar els nivells de consum d'oxigen en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Experiment representatiu on es mostren els valors de consum d'oxigen de mioblasts control (vermell) o amb pèrdua de funció de Mfn1 (rosa) en diferents estats respiratoris: Rutina (R), *proton leak* (L), capacitat respiratòria màxima (E) i respiració no mitocondrial (ROX). En les línies verticals blaves amb lletres s'indica el moment on s'han afegit les diferents drogues: Oligomicina (A), FCCP (B), Rotenona (C) i Antimicina A (D). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard.

Els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1, presentaven un consum d'oxigen molt similar als control en rutina ($19,02 \pm 1,5$ pmol O_2 /min· μ g vs $20,24 \pm 1,51$ pmol O_2 /min· μ g). En canvi, presentaven un increment molt marcat en el consum d'oxigen quan es va inhibir l'ATP sintetasa amb l'oligomicina ($6,68 \pm 0,34$ pmol O_2 /min· μ g vs $15,73 \pm 1,22$ pmol O_2 /min· μ g), indicant una forta disfunció, ja que la majoria del consum d'oxigen en rutina no està associat a la producció d'ATP (Figura 79). De totes maneres, no és tant marcat com en el cas de Opa1. A més, presentaven una disminució molt marcada en el consum d'oxigen en afegir el desacoblant FCCP ($51,28 \pm 5,56$ pmol O_2 /min· μ g vs $24,44 \pm 2,34$ pmol O_2 /min· μ g), utilitzat per veure la capacitat respiratòria màxima. Finalment, el consum d'oxigen residual o no mitocondrial (ROX), es va

obtenir inhibint el complex I amb Rotenona i inhibint el complex III amb Antimicina A. En aquest cas, els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 també tenien el consum d'oxigen bastant augmentat respecte als control (4,34±0,41 pmol O₂/min·µg vs 8,51±0,87 pmol O₂/min·µg) (Figura 79).

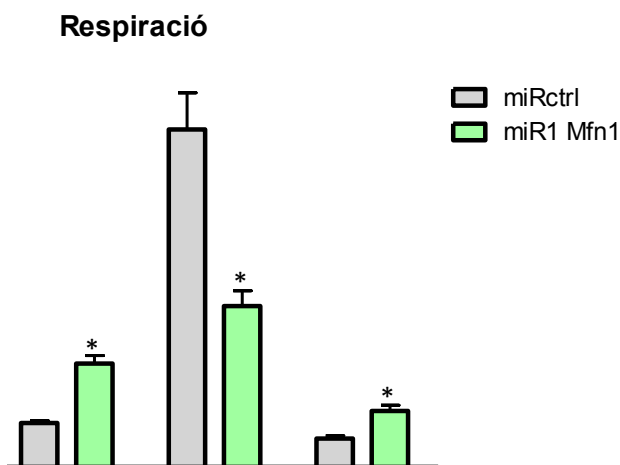


Figura 79. Determinació dels nivells de respiració en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Anàlisi dels nivells de consum d'oxigen mitocondrial en mioblasts C2C12 control o amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 mitjançant el XF24 *Extracellular Flux Analyzer* de Seahorse Bioscience. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1, posteriorment destriades per citometria de flux i finalment sembrades en plaques per ser analitzades. Es va utilitzar com a substrat 5mM de glucosa. El *proton leak* (respiració independent de la síntesi d'ATP) es va induir afegint 1,25 µM d'oligomicina, per inhibir el complex V. La capacitat màxima del sistema es va induir afegint 1 µM de FCCP (un desacoblador). ROX (respiració no mitocondrial) es va induir afegint 0,1 µM de Rotenona (inhibidor del complex I) i 0,1 µM d'Antimicina A (inhibidor del complex III). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ respecte cada control, obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

A més, restant ROX dels valors obtinguts en cada un dels estats, s'obté específicament el consum d'oxigen mitocondrial. Així doncs, els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 presentaven un lleuger menor consum d'oxigen mitocondrial en rutina (a diferència del mostrat anteriorment, que era superior) respecte als control ($14,69 \pm 1,70$ pmol $O_2/\text{min} \cdot \mu\text{g}$ vs $11,74 \pm 1,05$ pmol $O_2/\text{min} \cdot \mu\text{g}$), tot i que sense ser significatiu (Figura 80). En canvi, seguien presentant un increment molt marcat en el consum d'oxigen mitocondrial quan es va inhibir l'ATP sintetasa amb l'oligomicina ($2,34 \pm 0,30$ pmol $O_2/\text{min} \cdot \mu\text{g}$ vs $7,23 \pm 0,80$ pmol $O_2/\text{min} \cdot \mu\text{g}$), indicant una forta disfunció, ja que la majoria del consum d'oxigen en rutina no està associat a la producció d'ATP. De la mateixa manera, presentaven una disminució molt marcada en el consum d'oxigen mitocondrial en afegir el desacoblant FCCP ($46,94 \pm 5,79$ pmol $O_2/\text{min} \cdot \mu\text{g}$ vs $15,93 \pm 1,76$ pmol $O_2/\text{min} \cdot \mu\text{g}$), utilitzat per veure la capacitat respiratòria màxima (Figura 80).

spiració mitocondrial

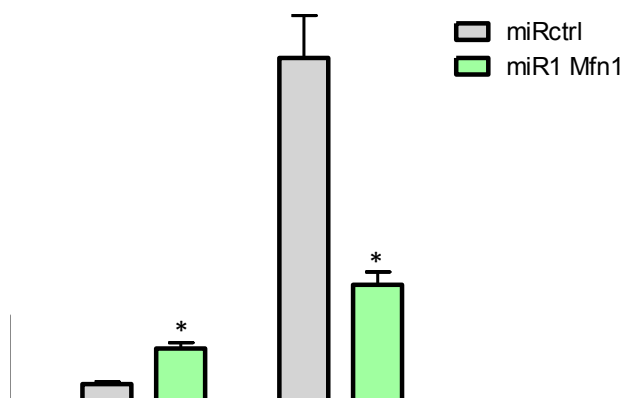


Figura 80. Determinació dels nivells de respiració mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Anàlisi dels nivells de consum d'oxigen mitocondrial en mioblasts C2C12 control o amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 mitjançant el XF24 *Extracellular Flux Analyzer* de Seahorse Bioscience. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1, posteriorment destriades per citometria de flux i finalment sembrades en plaques per ser analitzades. Es va utilitzar com a substrat 5mM de glucosa. El *proton leak* (respiració independent de la síntesi d'ATP) es va induir afegint 1,25 μM d'oligomicina, per inhibir el complex V. La capacitat màxima del sistema es va induir afegint 1 μM de FCCP (un desacoblant). ROX (respiració no mitocondrial) es va induir afegint 0,1 μM de Rotenona (inhibidor del complex I) i 0,1 μM d'Antimicina A (inhibidor del complex III). Per tal d'obtenir el consum d'oxigen mitocondrial, es va restar el valor de ROX del valor absolut del consum d'oxigen. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ respecte cada control, obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

A partir d'aquests valors, es van calcular les *Flux control ratios*, que ens donen informació sobre el grau d'acoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. Respecte al *Routine Flux Control Ratio (R/E)* i al *Leak Flux Control Ratio (L/E)*, es va observar un increment molt marcat en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 (Figura 81A i 81B), indicant que aquests mioblasts treballaven pràcticament al màxim de la seva capacitat (Figura 81A) i que, a més, tenien un augment molt gran del *proton leak* respecte la capacitat respiratòria màxima, indicant un fort desacoblament (Figura 81B). De fet, si ens fixem en els valors absoluts de consum d'oxigen mitocondrial destinats a la síntesi d'ATP, es pot observar que aquest consum d'oxigen mitocondrial en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 és pràcticament 3 cops inferior si ho comparem amb els mioblasts C2C12 control (Figura 82). Per una altra banda, no hi ha diferències en la *Phosphorylation Respiratory Control Ratio ((R-L)/E)*, indicant que la respiració associada a la producció d'ATP respecte la capacitat màxima es molt semblant (Figura 81C).

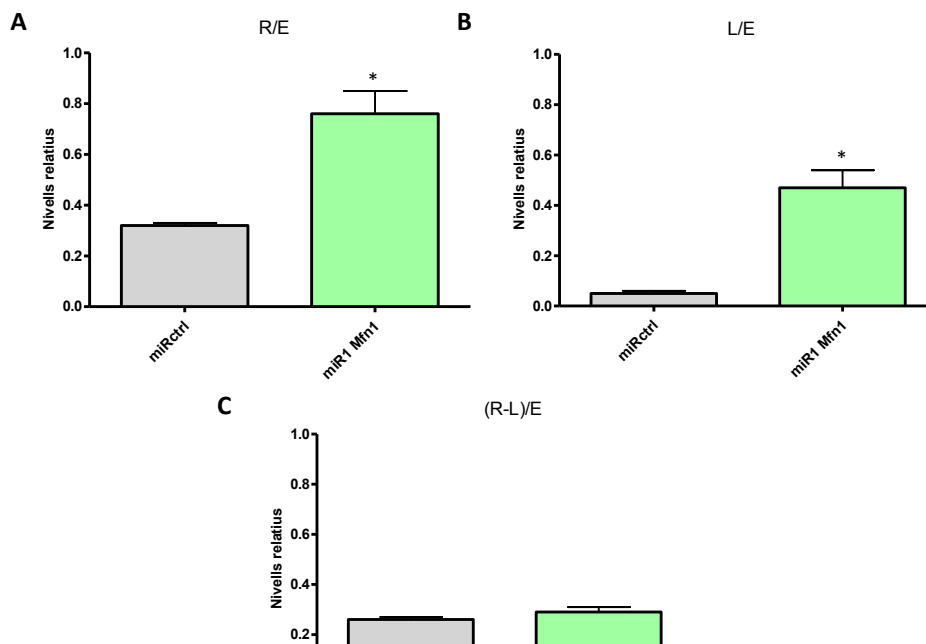


Figura 81. Determinació de les Flux Control Ratios en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. La (A) Routine Flux Control Ratio (R/E), la (B) Leak Flux Control Ratio (L/E) i la (C) Phosphorylation Respiratory Control Ratio ((R-L)/E) es van calcular a partir dels valors de consum d'oxigen mitocondrial obtinguts i mostrats anteriorment (Figura 20); on R és el consum d'oxigen en rutina, L en l'estat de *proton leak* i E en l'estat de capacitat respiratòria màxima. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

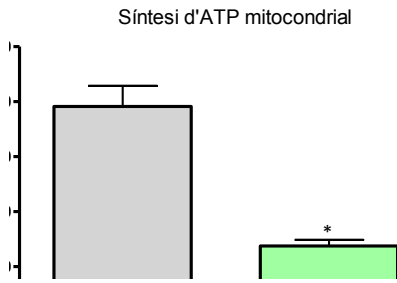


Figura 82. Determinació dels valors absoluts de consum d'oxigen mitocondrial destinats a la síntesi d'ATP mitocondrial en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. El valor absolut de consum d'oxigen mitocondrial destinat a la síntesi d'ATP mitocondrial es va calcular restant el valor del consum d'oxigen absolut en estat de rutina (R) amb l'obtingut en l'estat de *proton leak* (L). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

Per una altra banda, es va voler veure si aquesta disminució en el consum d'oxigen mitocondrial per a la síntesi d'ATP era compensada per glicòlisi. A continuació, es mostra un exemple d'un experiment (Figura 83).

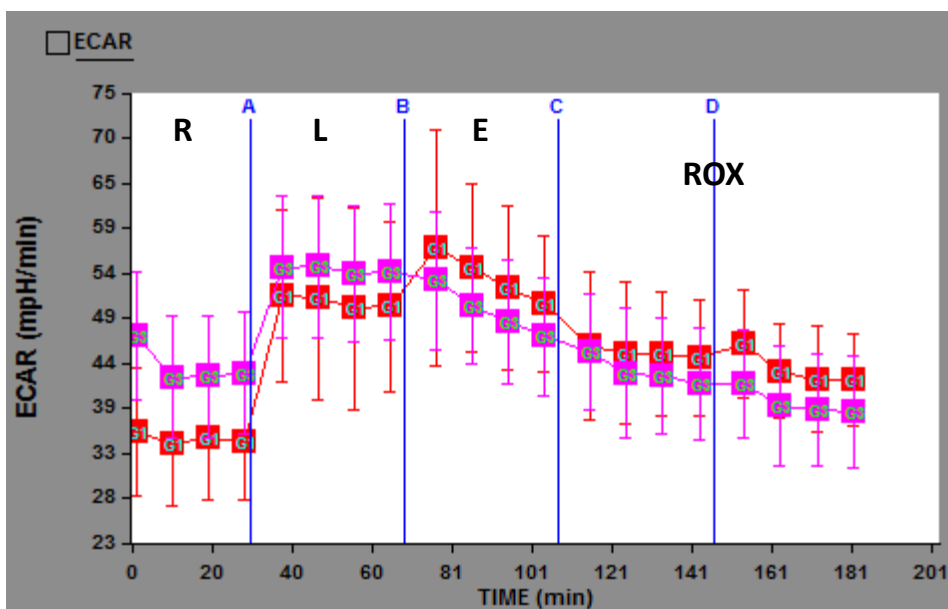


Figura 83. Assaig de respirometria per mesurar els nivells de ECAR (taxa d'acidificació del medi extracel·lular) en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Experiment representatiu on es mostren els valors de ECAR de mioblasts control (vermell) o amb pèrdua de funció de Opa1 (blau) en diferents estats respiratoris: Rutina (R), *proton leak* (L), capacitat respiratòria màxima (E) i respiració no mitocondrial (ROX). En les línies verticals blaves amb lletres s'indica el moment on s'han afegit les diferents drogues: Oligomicina (A), FCCP (B), Rotenona (C) i Antimicina A (D). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard.

Així doncs, es va decidir estudiar el flux glicolític en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. Com es pot observar en la Figura 84, es veu que en l'estat de rutina aquest flux glicolític és un 25% superior en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 respecte als control, suggerint que aquesta via està augmentada per poder compensar la falta de síntesi d'ATP mitocondrial.

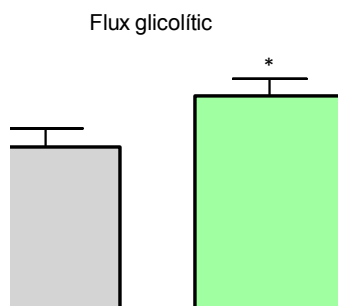


Figura 84. Determinació del flux glicolític en rutina de mioblasts C2C12 control i mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Anàlisi de la ECAR en rutina de mioblasts C2C12 control o amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 mitjançant el XF24 *Extracellular Flux Analyzer* de Seahorse Bioscience. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1, posteriorment destriades per citometria de flux i finalment sembrades en plaques per ser analitzades. Es va utilitzar com a substrat 5mM de glucosa. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb una cua de distribució.

4.2.3.5 Producció de ROS

Degut a que els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 tenien un fort desacoblament entre el consum d'oxigen mitocondrial en rutina i el destinat a la producció d'ATP, es va pensar que, en aquestes circumstàncies, s'estarien produint més anions superòxid. Així doncs, es va decidir mesurar els nivells de anions superòxid produïts mitjançant la sonda *Mitoxox* per citometria de flux. Sorprenentment, es va veure una caiguda del 13% en la producció d'anions superòxid en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 (Figura 85A), tot i que a Dia 1 no es van observar canvis (Figura 85B). Per tal de comparar-ho amb l'altre proteïna de fusió de la membrana mitocondrial

externa, també es van mesurar per Mfn2. En aquest cas, es va veure una caiguda significativa del 25% en la producció d'anions superòxid en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2, tant a Dia 0 com a Dia 1 (Figura 86).

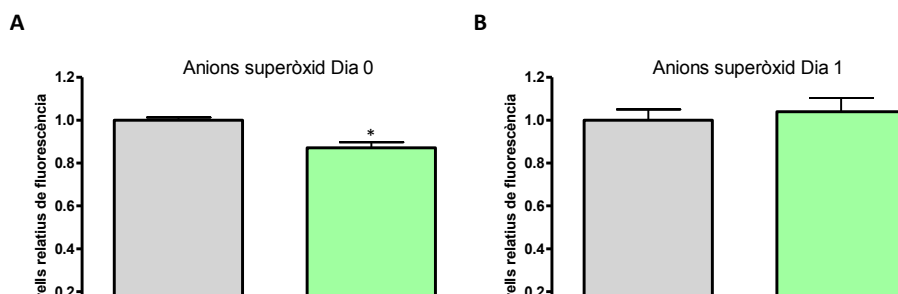


Figura 85. Determinació de la producció d'anions superòxid de les mitocondries en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 i Dia 1. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 i analitzats per citometria de flux mesurant els nivells d'intensitat de fluorescència obtinguts mitjançant el colorant *Mitox* en mioblasts C2C12 a Dia 0 (A) i a Dia 1 (B). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,001$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

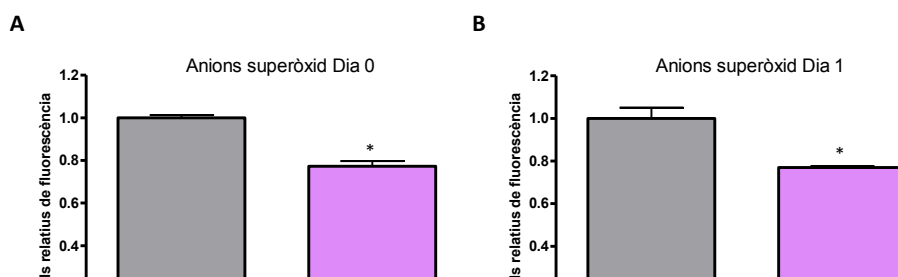


Figura 86. Determinació de la producció d'anions superòxid de les mitocòndries en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 a Dia 0 i Dia 1. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb cinc miRNA contra Mfn2 i analitzats per citometria de flux mesurant els nivells d'intensitat de fluorescència obtinguts mitjançant el colorant *Mitosox* en mioblasts C2C12 a Dia 0 (A) i a Dia 1 (B). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

Seguidament, es va decidir mirar els nivells de peròxid d'hidrogen en lisats totals fent servir la sonda *Amplex Red*, on es va apreciar que els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 produïen un 43% més de peròxid d'hidrogen en comparació amb els mioblasts C2C12 control (Figura 87). En canvi, en el cas dels mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2, no es van observar diferències (Figura 88).

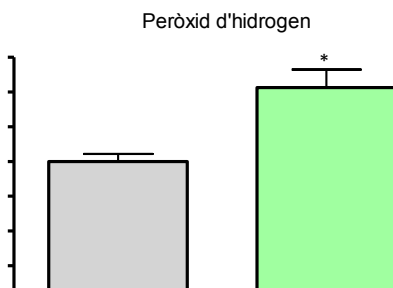


Figura 87. Determinació de la producció de peròxid d'hidrogen en lisats totals de mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1, posteriorment lisats a Dia 0 i finalment analitzats per espectrofotometria a 560nm mitjançant l'ús de la sonda *Amplex Red*. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

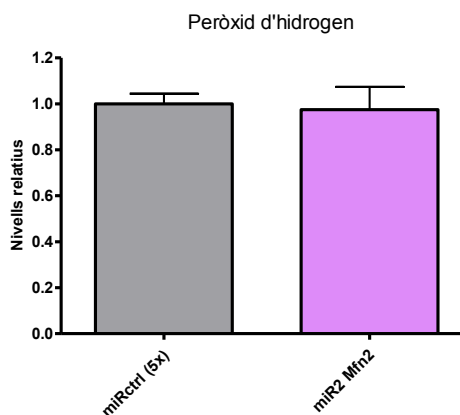


Figura 88. Determinació de la producció de peròxid d'hidrogen en lisats totals de mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 a Dia 0. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb cinc miRNA contra Mfn2, posteriorment lisats a Dia 0 i finalment analitzats per espectrofotometria a 560nm mitjançant l'ús de la sonda *Amplex Red*. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents

Això ens va fer pensar que, com en el cas dels mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció en Opa1, l'enzim superòxid dismutasa (SOD) de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 catalitzava ràpidament el pas d'anions superòxid produïts pel sistema OXPHOS a peròxid d'hidrogen o que aquest peròxid d'hidrogen no provenia dels anions superòxid produïts pel sistema OXPHOS. Per tant, es va decidir utilitzar la sonda *mitoHyPer* mitjançant l'ús d'un adenovirus, que també contenia en la part codificant la GFP pel seu correcte monitoratge *'in vivo'*.

Si ens fixem en la Figura 89 i 90, es pot veure que els mioblasts C2C12 de Dia 0 amb pèrdua de funció de Mfn1⁴ presenten uns nivells de peròxid d'hidrogen

⁴ Per a poder realitzar aquest experiment, es van redissenyar i produir nous adenovirus control i adenovirus amb dos miRNA contra Opa1 per eliminar la GFP, ja que sinó no s'hauria pogut utilitzar l'adenovirus que conté la *mitoHyPer*. No obstant, els miRNA que contenen són exactament els mateixos que els utilitzats en els adenovirus amb GFP, emprats per la majoria d'experiments.

mitocondrials més alts *'in vivo'* si es comparen amb els observats en mioblasts C2C12 control, confirmant que aquest peròxid d'hidrogen prové de la sobreproducció d'anions superòxid probablement com a conseqüència del desacoblament del sistema OXPPOS i suggerint que és la senyal clau que desencadena la menor diferenciació miogènica d'aquests mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1.

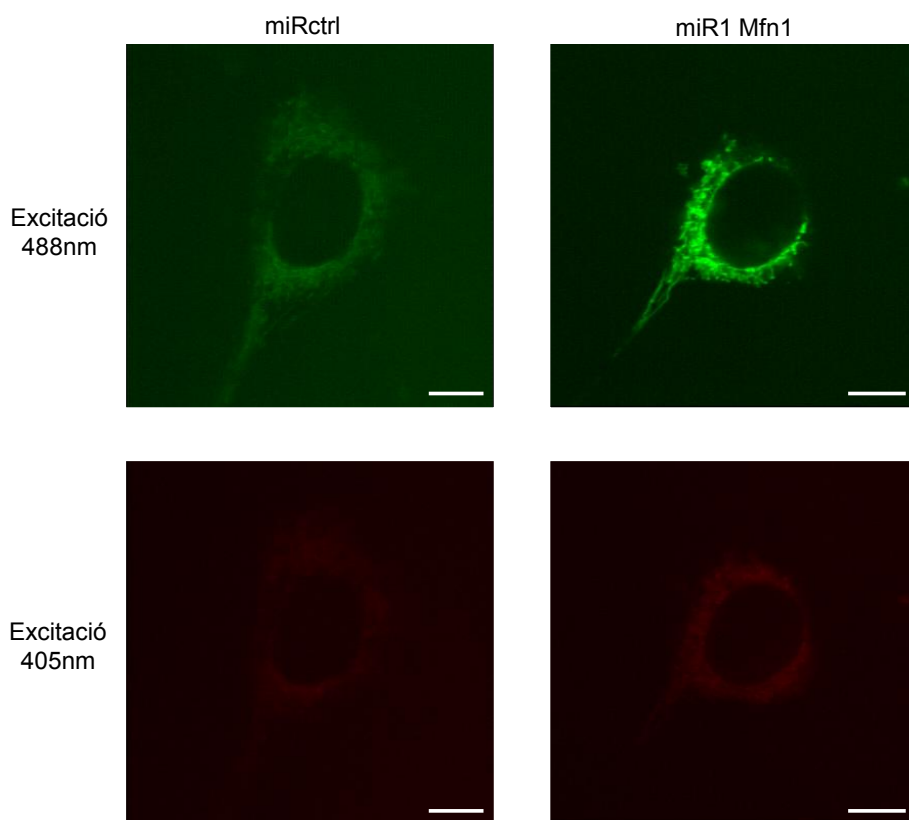


Figura 89. Determinació de la producció de peròxid d'hidrogen *'in vivo'* en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 més un adenovirus que conté la mitoHyPer (doble transducció). Posteriorment van ser analitzats per microscòpia confocal *'in vivo'*, obtenint en una única ona d'emissió a 495nm dues fluorescències diferents a partir de dues ones d'excitació diferents (a 405nm i a 488nm). Les imatges són representatives de 2 experiments independents, analitzant 50 mioblasts per cada un d'ells. Barra d'escala 10µm.

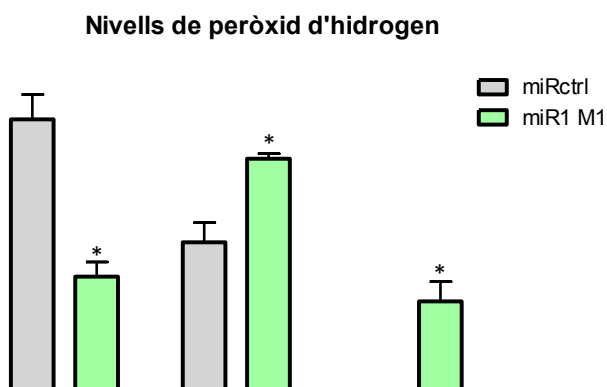


Figura 90. Quantificació dels nivells de peròxid d'hidrogen 'in vivo' en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 més un adenovirus que conté la mitoHyPer (doble transducció). Tant pels mioblasts C2C12 control com pels mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0, es van obtenir dues fluorescències diferents a 495nm a partir les dues ones d'excitació diferents (a 405nm i a 488nm). Tot seguit, es va fer la relació 488/405 i els valors es van dividir en 3 grups diferents. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard d'un total de 100 mioblasts analitzats en dos experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb una cua de distribució.

Finalment i per tal d'avaluar el nivell de dany oxidatiu dels mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1, es va decidir mirar per *Western Blot* la carbonilació de proteïnes, ja que es tracta d'un dany oxidatiu irreversible i lligat a la pèrdua de funcionalitat proteica. Tot i que ja s'ha demostrat que aquests mioblasts amb pèrdua de funció de Mfn1 tenien uns nivells de peròxid d'hidrogen més elevats que els mioblasts controls, no es van apreciar diferències en quan als nivells de carbonilació de proteïnes (Figura 91).

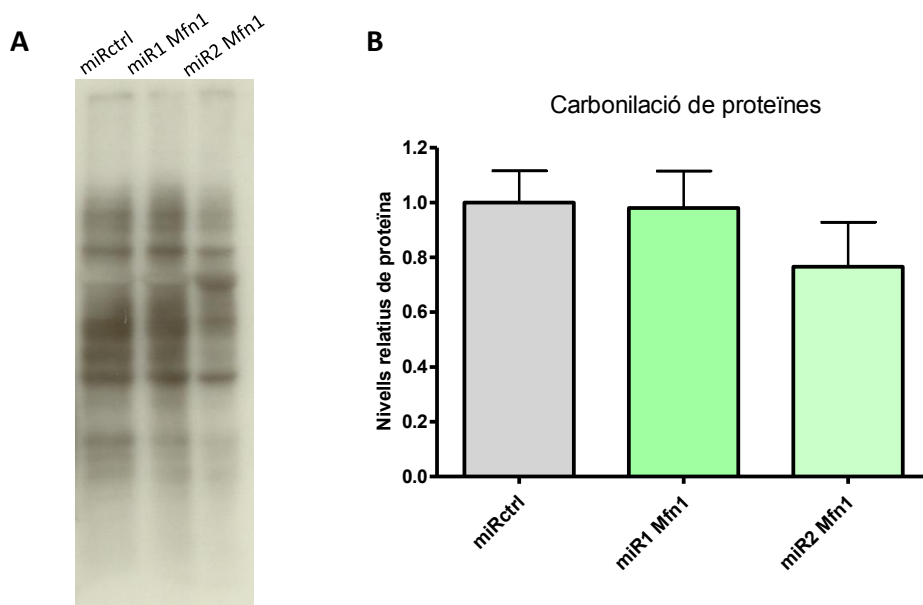


Figura 91. Determinació dels nivells de carbonilació de proteïnes en mioblasts C2C12 control i de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1, posteriorment destriades per citometria de flux i finalment lisades per realitzar el *Western Blot*. **(A)** Experiment representatiu dels nivells de carbonilació de proteïnes en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 20µg de proteïna provinents de lisats totals. **(B)** El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents.

4.2.4 Efectes de la deficiència de Mfn1 sobre la diferenciació miogènica

4.2.4.1 Morfologia durant la diferenciació miogènica

Per tal de comprovar la rellevància de Mfn1 durant la miogènesi, es va observar la morfologia a nivell cel·lular durant tot el procés de diferenciació (Figura 92). Aparentment, no es van veure canvis durant els primers dos dies però si ens fixem a Dia 4, es poden observar unes diferències molt significatives. D'aquesta manera, a la primera columna de la Figura 4 podem veure un procés de

diferenciació normal en cèl·lules C2C12 control, observant uns miotubs llargs i gruixuts a Dia 4. En canvi, si ens fixem en la segona i tercera columna, aquest procés no es finalitza per complet, ja que els miotubs que es formen en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 són molt més prims i curts, els quals es podien confondre amb miòcits (miotubs immadurs típics de Dia 2 de diferenciació).

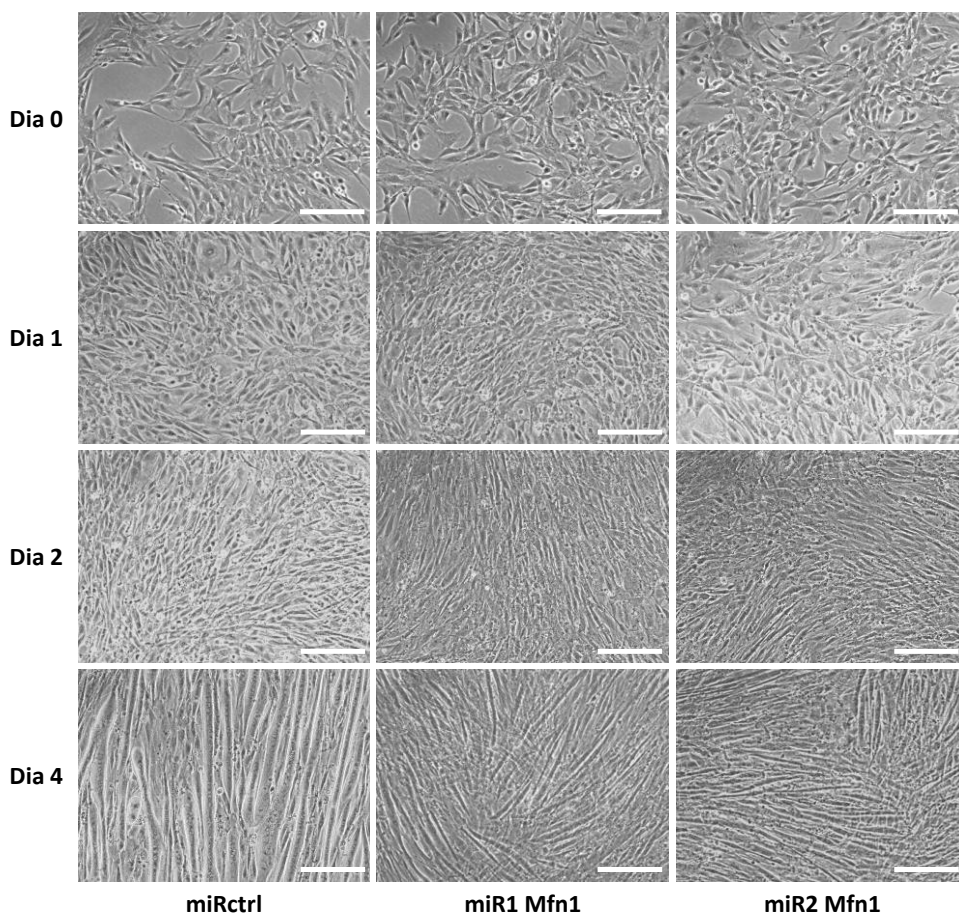


Figura 92. Canvis morfològics observats durant la diferenciació miogènica a partir de mioblasts C2C12 control i de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. Experiment representatiu de l'anàlisi morfològic a Dia 0, 1, 2 i 4 en cèl·lules C2C12 transduïdes 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 i diferenciades a partir d'aleshores fins a Dia 4. Barra d'escala 200µm.

4.2.4.2 Marcadors de diferenciació miogènica

Després de comprovar morfològicament per microscòpia òptica que els mioblasts amb pèrdua de funció de Mfn1 no diferenciaven correctament, es va decidir confirmar aquests canvis mitjançant l'anàlisi per *Real-Time PCR* (Figura 93) i *Western Blot* (Figura 95 i 96) d'una sèrie de marcadors tardans de diferenciació. Com es pot observar en aquestes figures, es van analitzar per *Real-Time PCR* una sèrie de gens (alguns involucrats en la maquinària de contracció muscular i l'homeòstasi de calci específica de múscul (Casq1, Chrne, Mybpc2, Myh4, Serca1, Serca2, i Tnnt3) i altres independents del tipus de fibra (Cav3 i Gys), obtenint resultats similars per tots ells, és a dir, presentant una reducció dels seus nivells d'expressió des d'un 53% fins a un 91%. A més, si s'observa l'expressió proteica de marcadors tardans de diferenciació típics de miotubs madurs tal i com la Caveolina 3 (Cav3) o la cadena pesada de la miosina (MHC), es veu una reducció de més del 90%, evidenciant una clara alteració en la miogènesi.

Per tal de descobrir quin era el pas clau que estava involucrat en aquesta alteració en la diferenciació, es va analitzar el perfil d'inducció de 2 gens màster de diferenciació muscular (MyoD i Miogenina) en cèl·lules C2C12 control i en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 durant tot el procés de miogènesi per *Real-Time PCR* (Figura 94) i per *Western Blot* (Figura 95 i 96). Com es pot observar en la Figura 94A, 95 i 96, l'expressió de MyoD en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 és normal a l'inici de la diferenciació però es redueix de manera molt marcada durant el procés, sent significatiu a nivells proteics a partir de Dia 1. En canvi, sota les mateixes condicions, l'expressió de la Miogenina estava molt reduïda tant per mRNA com per proteïna ja des de Dia 0 (Figura 94B, 95 i 96).

Gens específics de múscul

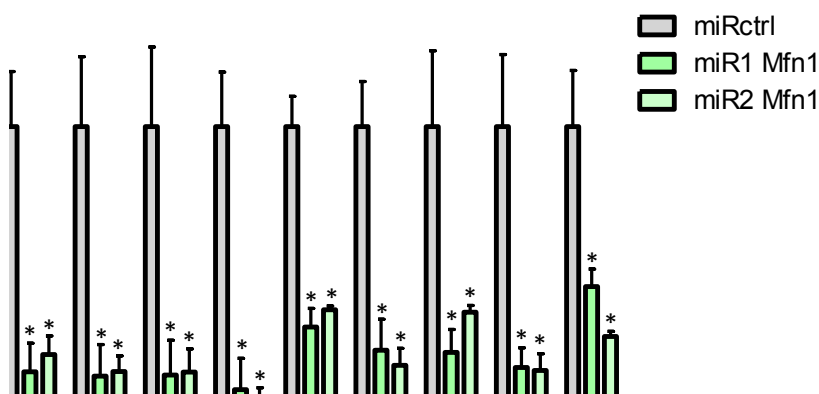


Figura 93. Determinació dels nivells de mRNA de gens específics de múscul en miotubs C2C12 control i en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. Anàlisi per *Real-Time PCR* dels nivells de Calsequestrina 1, receptor colinèrgic, glicogen sintasa, proteïna d'unió a miosina, cadena pesada de la miosina 4, SERCA1, SERCA2, troponina T tipus 3 i Caveolina 3 relativitzats a ARP (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

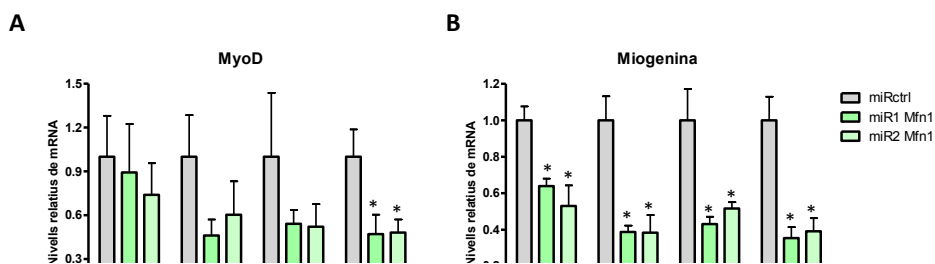


Figura 94. Determinació dels nivells de mRNA de MyoD i Miogenina (gens màster) durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control i en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. Anàlisi per *Real-Time PCR* dels nivells de MyoD (A) i Miogenina (B) relativitzats a ARP (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 4 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

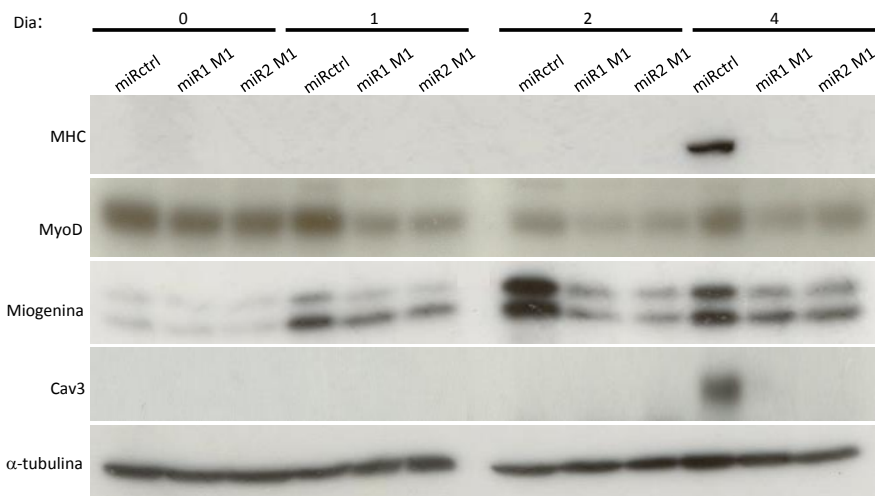


Figura 95. Determinació dels nivells de proteïna de MyoD i Miogenina (marcadors primerencs) i de Cav3 i la MHC (marcadors tardans) durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control i en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1. Anàlisi per *Western Blot* de diferents marcadors miogènics a Dia 0, 1, 2 i 4 en cèl·lules C2C12 transduïdes 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 i diferenciades a partir d'aleshores fins a Dia 4. Experiment representatiu dels nivells de MyoD, Miogenina, Caveolina 3 i la MHC en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de cèl·lules C2C12.

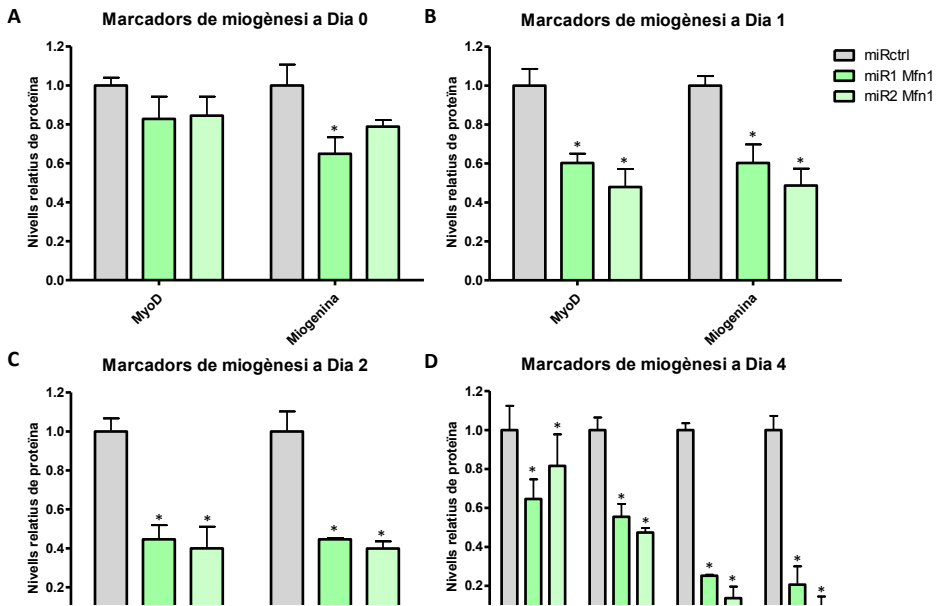


Figura 96. Determinació dels nivells relatius de proteïna MyoD, Miogenina, MHC i Cav3 durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control i amb pèrdua de funció de Mfn1. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 4 experiments independents, obtinguts de l'anàlisi per densitometria dels nivells relatius de les proteïnes MyoD, Miogenina, MHC i Cav3 corregits per la α -tubulina a Dia 0 (A), Dia 1 (B), Dia 2 (C) i Dia 4 (D) en cèl·lules C2C12 transduïdes 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 (miR1 i miR2) i diferenciades a partir d'aleshores fins a Dia 4. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb una cua de distribució.

4.2.4.3 Activitat transcripcional de factors clau de miogènesi

Per determinar si aquesta disminució en la expressió de marcadors tant primerencs com tardans en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 tenia lloc per una reducció en l'activació específica del promotor de la Miogenina, es van realitzar experiments de cotransfecció amb un plasmidi que contenia un fragment de 184bp del promotor murí de la Miogenina, el qual controlava l'expressió del gen reporter luciferasa, i un plasmidi que conté la

Renilla (utilitzada com a gen *housekeeping*). A més, es va dur a terme un altre experiment on es va analitzar l'activitat transcripcional d'un constructe quimèric que consistia en el domini d'unió Gal4 (Gal4 DBD), el qual controla l'expressió del gen reporter luciferasa, fusionat a MyoD (Gal4 DBD-MyoD), on també es va utilitzar la Renilla com a gen *housekeeping*. En ambdós casos, es veu una reducció en l'activitat transcripcional d'un 50% en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 respecte els controls (Figura 97A i 98A).

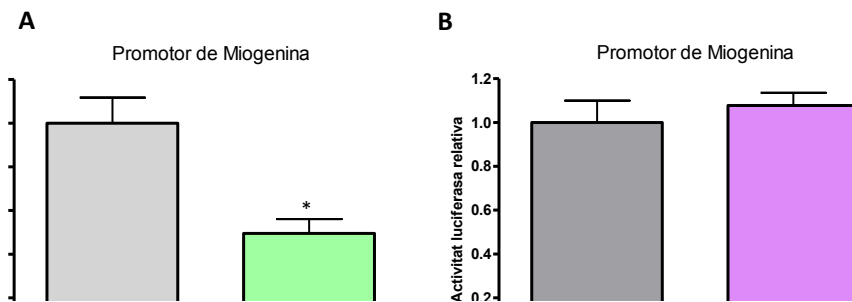


Figura 97. Determinació dels nivells d'activitat transcripcional d'un fragment del promotor de la Miogenina en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 i Mfn2 a Dia 0. Anàlisi per luminometria de l'activitat transcripcional d'un fragment del promotor de la Miogenina relativitzats a Renilla (gen emprat com a *housekeeping*) en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 (A) i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 (B) a Dia 0. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 5 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

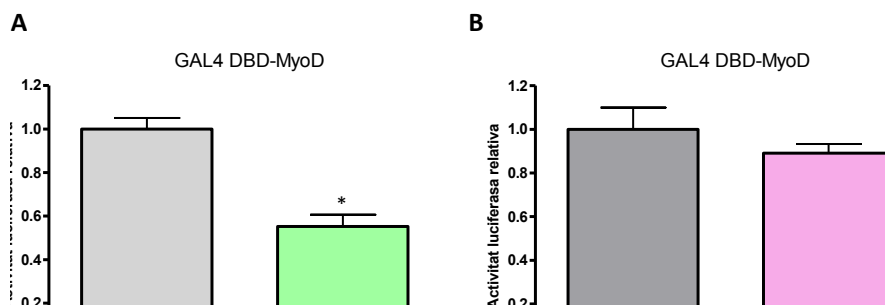


Figura 98. Determinació dels nivells d'activitat transcripcional de Gal4 DBD-MyoD en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 i Mfn2 a Dia 0. Anàlisi per luminometria de l'activitat transcripcional d'aquest constructe relativitzats a Renilla (gen emprat com a *housekeeping*) en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 (A) i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 (B) a Dia 0. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,01$ sobre el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

Per tal de contrastar aquests resultats obtinguts en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 i Mfn1, també es van analitzar els nivells d'activitat transcripcional d'un fragment del promotor de la Miogenina i de Gal4 DBD-MyoD en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 a Dia 0. Com es pot observar a la Figura 97B i 98B, no es van trobar diferències respecte al seu control, indicant que la caiguda en l'activitat transcripcional en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 i Mfn1 és específic d'aquestes proteïnes i no de les proteïnes de fusió mitocondrial.

4.2.4.4 Senyalització entre funció mitocondrial i diferenciació miogènica deguda a la deficiència de Mfn1

4.2.4.4.1 Inhibidors de MyoD

Per tal de descobrir quina era la causa de la disminució en la activitat del promotor de Miogenina i del constructe quimèric amb MyoD en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1, es va mirar per *Real-Time PCR* l'expressió d'una sèrie de gens responsables d'inhibir MyoD, ja fos per via directa (Id, Twist, N-CoR, COUP-TFII, I-mfa, cJun i cdk4) o per via indirecta (Id, MyoR, I-mfa i ZEB) durant els estadis inicials de la diferenciació miogènica. Com es pot observar a la Figura 99A, no hi ha augment en cap d'aquests gens en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 però en canvi, sorprèn el fet que n'hi hagi un miRNA per MyoR i un miRNA per N-CoR que estiguin disminuïts. Aquest fet podria ser degut a un intent per compensar els baixos nivells de MyoD per tal d'augmentar-ne la seva activitat. En canvi, si ens fixem en l'expressió d'aquests gens a Dia 1 (Figura 99B), no veiem cap canvi significatiu excepte en un miRNA per l'inhibidor I-mfa. No obstant, no es va tenir gaire en compte ja que a Dia 0 no vam observar cap canvi en aquest gen.

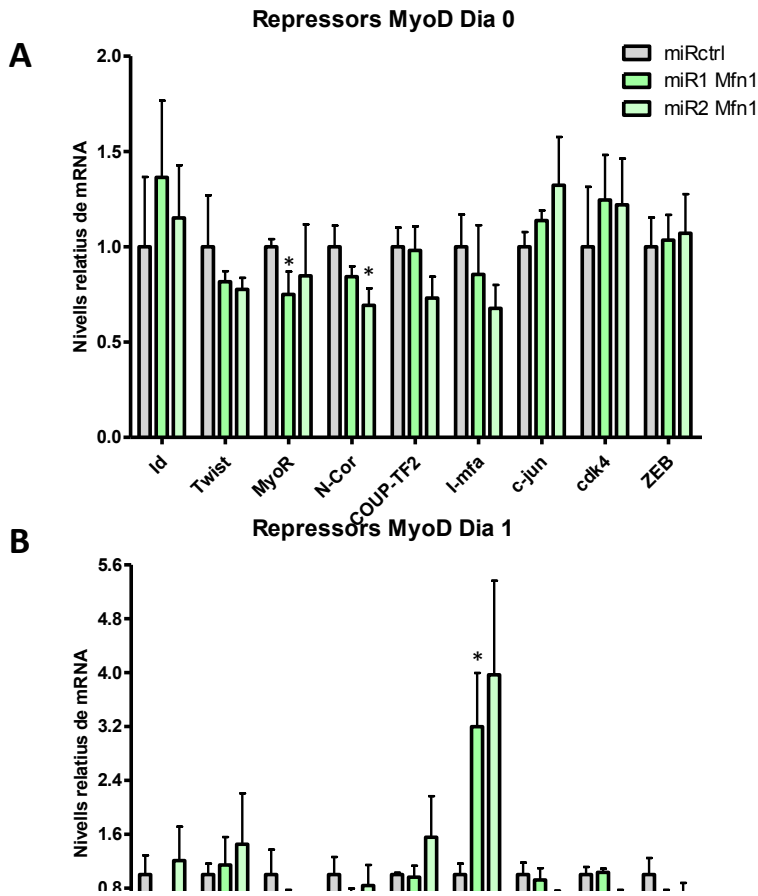


Figura 99. Determinació dels nivells de mRNA de *Id*, *Twist*, *MyoR*, *N-cor*, *COUP-TF2*, *I-mfa*, *c-jun*, *cdk4* i *ZEB* en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de *Mfn1* a Dia 0 i 1. Anàlisi per *Real-Time PCR* dels nivells de diferents repressors de *MyoD* en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de *Mfn1* de Dia 0 (A) i Dia 1 (B) relativitzats a *ARP* (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre el control obtingudes mitjançant una *t* d'Student amb una cua de distribució.

4.2.4.4.2 Reguladors de la miogènesi: p38, ERK, JNK i NF- κ B

Seguint amb la idea de trobar quin era el mecanisme pel qual la pèrdua de funció de Mfn1 en cèl·lules C2C12 dona lloc a una menor diferenciació miogènica traduïda en una menor expressió i activitat d'alguns marcadors de miogènesi, es va decidir estudiar diferents cascades de senyalització que estan involucrades i són imprescindibles per a dur a terme una correcta diferenciació miogènica. Així doncs, es va començar provant amb p38, que està involucrada en el procés de diferenciació miogènica (Keren, Tamir, and Bengal 2006; Lluís et al. 2006; Perdiguero et al. 2007); ERK1/2, involucrat en la proliferació dels mioblasts (N. C. Jones et al. 2001); i JNK, on hi ha certa controvèrsia (Khurana and Dey 2004; Meriane et al. 2000). Així doncs, s'esperava observar algun tipus de canvi en la fosforilació de residus clau en alguna d'aquestes vies però no se'n va trobar cap (Figura 100 i 101).

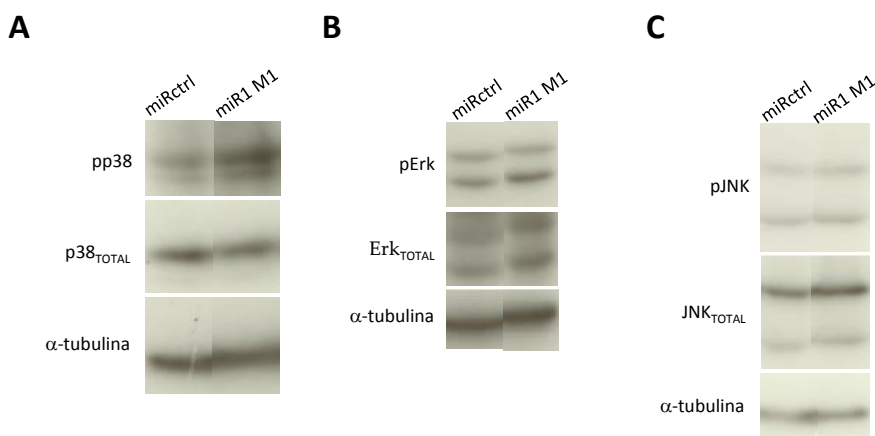


Figura 100. Determinació dels nivells de proteïna de p38, Erk i JNK en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Experiments representatius de l'anàlisi per *Western Blot* dels nivells de pp38 i p38_{TOTAL} (A), pErk i Erk_{TOTAL} (B) i pJNK i JNK_{TOTAL} (C) en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1.

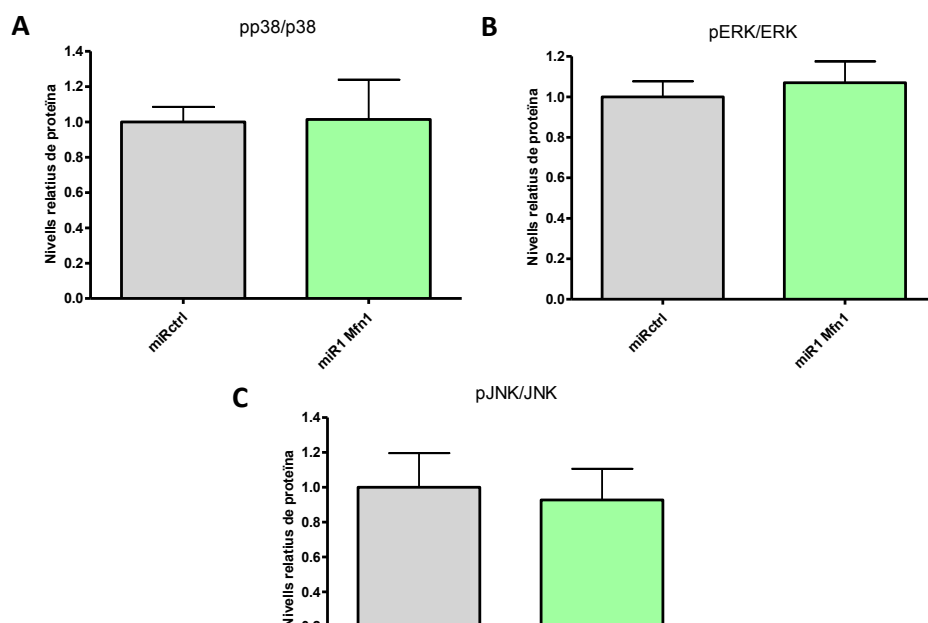


Figura 101. Determinació dels nivells relatius de proteïna de p38, Erk i JNK en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 6 experiments independents, obtinguts de l'anàlisi per densitometria dels nivells relatius de les proteïnes de pp38 i p38_{TOTAL} (A), pErk i Erk_{TOTAL} (B) i pJNK i JNK_{TOTAL} (C) i corregits per la α -tubulina en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40 μ g de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1.

Un cop descartades les vies de senyalització plantejades anteriorment, es va decidir estudiar la via de NF- κ B, ja que és un regulador clau de la retirada del cicle cel·lular i de la diferenciació miogènica (Guttridge et al. 2000; Hayden and Ghosh 2008). Si ens fixem en la Figura 102 i 103, es pot observar que no es troben diferències en la expressió de l'inhibidor I κ B- α però si amb I κ B- β tant a Dia 0 com a Dia 1, on veiem una completa degradació en mioblasts amb pèrdua de funció de Mfn1, indicant un possible augment en l'activitat d'aquesta via.

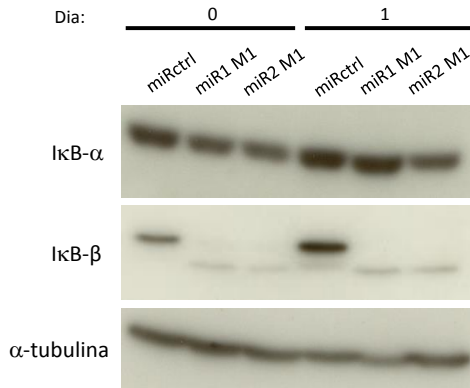


Figura 102. Determinació dels nivells de proteïna de IκB-α i IκB-β en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 i Dia 1. Experiments representatius de l'anàlisi per *Western Blot* dels nivells de IκB-α i IκB-β en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1.

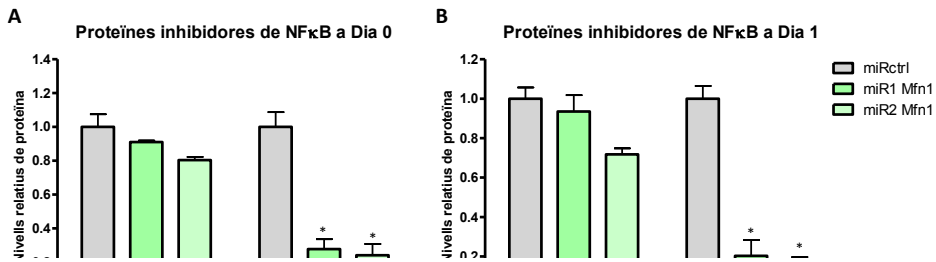


Figura 103. Determinació dels nivells relatius de proteïna de IκB-α i IκB-β en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 i Dia 1. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents, obtinguts de l'anàlisi per densitometria dels nivells relatius de les proteïnes IκB-α i IκB-β corregits per la α-tubulina de mioblasts C2C12 a Dia 0 (**A**) i Dia 1 (**B**) obtinguts a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre cada control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

Per tal de contrastar aquests resultats obtinguts en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 i Mfn1, també es van mirar els nivells proteics de

I κ B- α i I κ B- β en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 a Dia 0 i Dia 1, sense veure cap tipus de canvi (Figura 104 i 105).

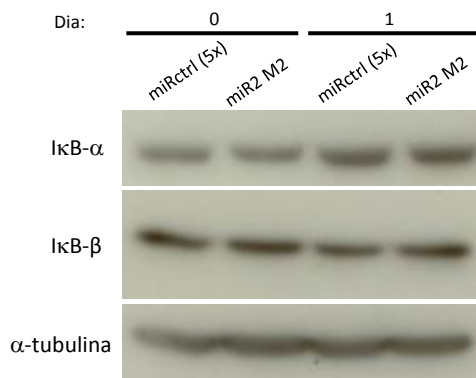


Figura 104. Determinació dels nivells de proteïna de I κ B- α i I κ B- β en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 a Dia 0 i Dia 1. Experiments representatius de l'anàlisi per *Western Blot* dels nivells de I κ B- α i I κ B- β en mioblasts C2C12 obtinguts a partir de 40 μ g de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb cinc miRNA contra Mfn2.

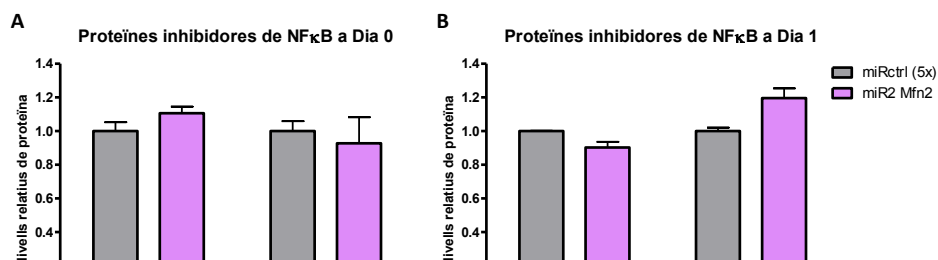


Figura 105. Determinació dels nivells relatius de proteïna de I κ B- α i I κ B- β en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 a Dia 0 i Dia 1. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents, obtinguts de l'anàlisi per densitometria dels nivells relatius de les proteïnes I κ B- α i I κ B- β corregits per la α -tubulina de mioblasts C2C12 a Dia 0 (A) i Dia 1 (B) obtinguts a partir de 40 μ g de proteïna provinents de lisats totals de *mioblasts* C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb cinc miRNA contra Mfn2.

Així doncs i per tal de confirmar el resultat obtingut en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1, es van realitzar experiments de cotransfecció amb un plasmidi 3κB, que conté 3 llocs NF-κB (per RelA, RelB i cRel) i controla l'expressió del gen reporter luciferasa, i un plasmidi que conté la Renilla. D'aquesta manera, es va observar que l'activitat transcripcional de 3κB estava augmentada fins a 4'7 cops en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 respecte els controls (Figura 106).

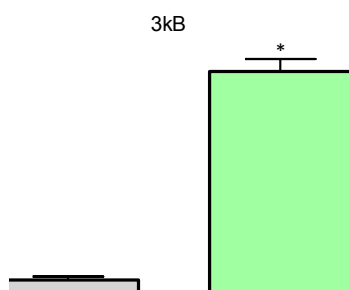


Figura 106. Determinació dels nivells d'activitat transcripcional del promotor de NFκB en mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0. Anàlisi per luminometria de l'activitat transcripcional d'un fragment comú de RelA, RelB i cRel que anomenem 3κB per analitzar l'activitat transcripcional del promotor de NfκB relativitzats a Renilla (gen emprat com a *housekeeping*). El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 3 experiments independents. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ sobre el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

4.2.5 Efectes de l'ús d'antioxidants sobre la diferenciació miogènica afectada per la deficiència de Mfn1

Un cop evidenciat que els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 produïen uns nivells de peròxid d'hidrogen mitocondrial més elevats que en els mioblasts C2C12 control, es va pensar en la possibilitat de reduir aquests nivells mitjançant l'ús d'antioxidants específics per veure si realment eren la causa

inicial de la menor diferenciació miogènica. Així doncs, inicialment es va provar el tractament puntual amb l'antioxidant NAC (N-Acetilcisteïna), un cop els mioblasts ja havien estat transduïts i abans que aquests comencessin el procés de diferenciació miogènica. La NAC és un principi actiu que produeix un augment dels dipòsits de glutatió, conferint una activitat antioxidant directe. No obstant, tot i que l'ús de la NAC en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 millorava la diferenciació miogènica, també millorava la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 control (resultats no mostrats). A més, tot i que l'ús de la NAC en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 milloraven els nivells de la proteïna Cav3 (marcador tardà que indica una bona formació de miotubs), també els incrementava en els miotubs controls (Figura 107). De fet, es va fer un segon experiment augmentant les concentracions de NAC però no es va observar cap milloria (resultats no mostrats). A més, tot i que l'ús de la NAC reduïa els nivells de peròxid d'hidrogen en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1, també els reduïa en els mioblasts C2C12 control, mantenint les proporcions entre els mioblasts C2C12 control i els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 (Figura 108). Per tant, es va pensar que no era un antioxidant prou específic del peròxid d'hidrogen mitocondrial de cara a realitzar un rescat de funció.

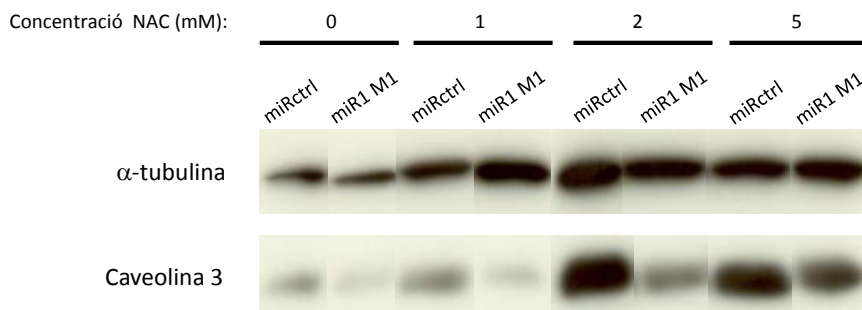


Figura 107. Determinació dels nivells de proteïna de Cav3 en miotubs C2C12 control i en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 amb o sense tractament de l'antioxidant NAC a Dia 4 de diferenciació. Anàlisi per *Western Blot* de la Cav3 en miotubs C2C12 obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 utilitzant diferents concentracions de l'antioxidant NAC, diferenciat a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Experiment únic, obtingut a partir de 40µg de proteïna provinents de lisats totals de miotubs C2C12

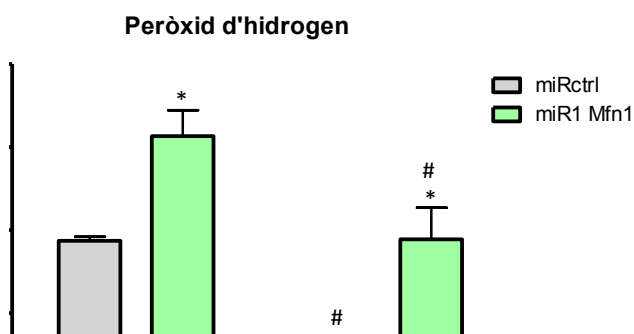


Figura 108. Determinació de la producció de peròxid d'hidrogen en lisats totals de mioblasts C2C12 control i en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 a Dia 0 amb o sense tractament amb NAC. Els mioblasts van ser transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 juntament amb 0 o 5mM de l'antioxidant NAC, posteriorment lisats a Dia 0 i finalment analitzats per espectrofotometria a 560nm mitjançant l'ús de la sonda *Amplex Red*. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte els seus controls, obtingudes mitjançant una t d'Student amb una cua de distribució. #mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte els NT, obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

Per una altra banda, els complexos de Salen de manganès EUK-134 i EUK-207 són dos antioxidants específics que mimetitzen la superòxid dismutasa i la catalasa (Figura 109) i es van utilitzar per veure si, reduint els nivells excessius de peròxid d'hidrogen, els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 recuperaven la correcta diferenciació miogènica. La diferència principal entre

aquests dos complexos és que l'EUK-207 és un antioxidant de “segona generació”, és a dir, és cíclic per augmentar la seva estabilitat (important sobretot per estudis *in vivo*).

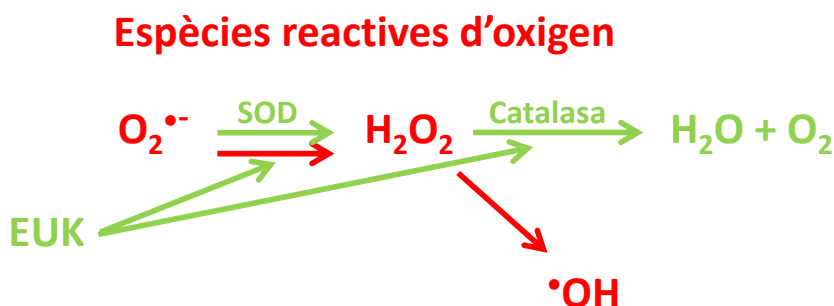


Figura 109. Diferents activitats dels complexos de Salen de manganès EUK-134 i EUK-207. En aquest esquema, es mostren les activitats superòxid dismutasa (SOD) i catalasa dels antioxidants EUK-134 i EUK-207, motiu pel qual es consideren mitoprotectors.

Inicialment, es va decidir utilitzar l'antioxidant EUK-207 durant l'estada al laboratori del Dr Orian Shirihai a Boston, MA. Com es pot observar, almenys a nivell morfològic, l'acció de l'EUK-207 sobre mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 millora la diferenciació miogènica (Figura 111 i 112). Tot i això, aquesta millora no es traduïa en forma d'anàlisi de marcadors bioquímics tardans de diferenciació (Figura 113).

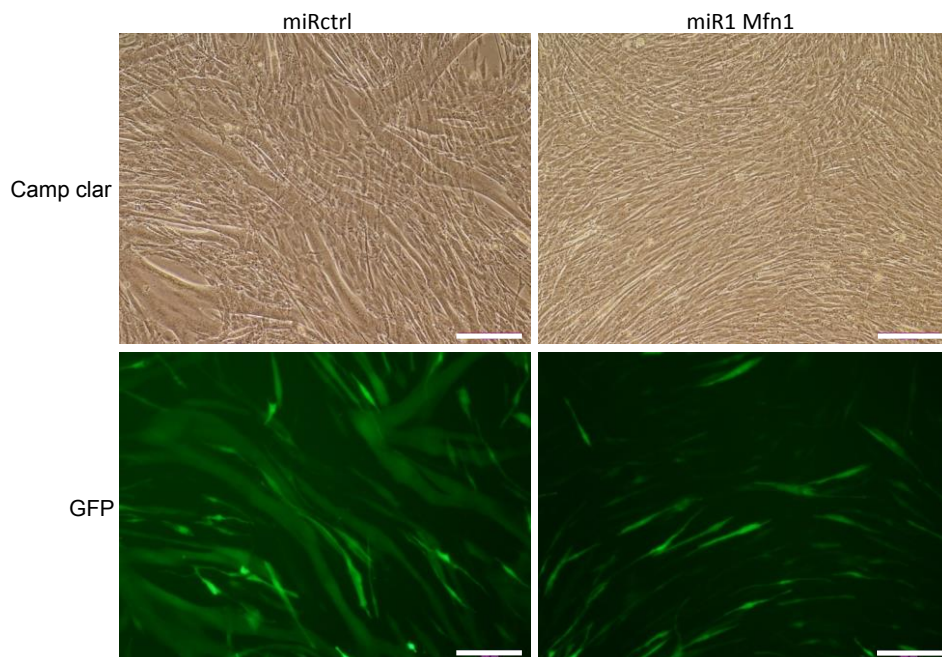


Figura 110. Morfologia de miotubs a Dia 4 de diferenciació obtinguts a partir de mioblasts C2C12 control i de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 sense l'ús de l'antioxidant EUK-207. Experiment representatiu de l'anàlisi morfològic de miotubs obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 sense l'ús de l'antioxidant EUK-207, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Barra d'escala 200 μ m.

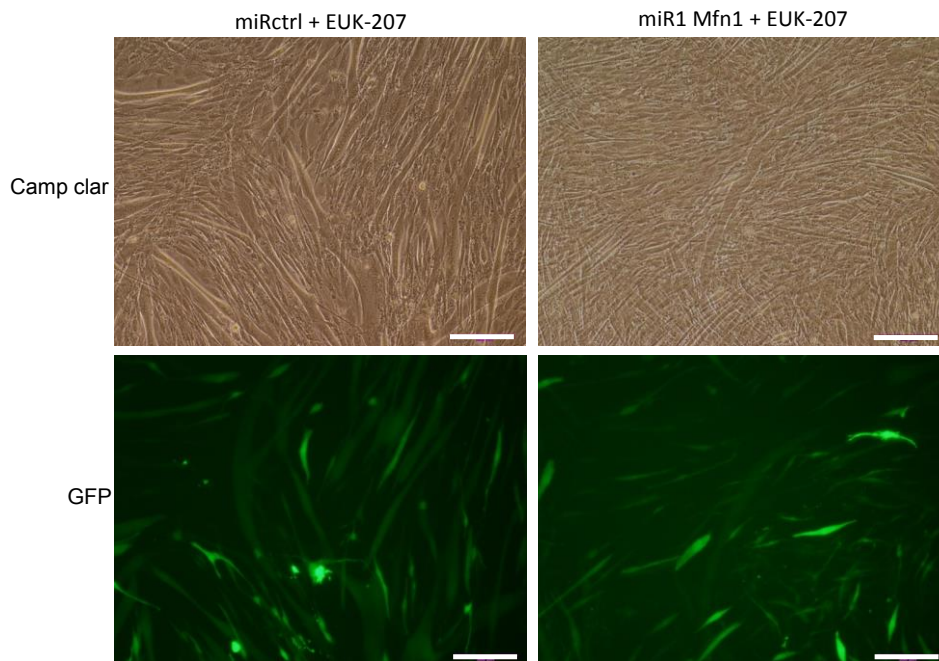


Figura 111. Morfologia de miotubs a Dia 4 de diferenciació obtinguts a partir de mioblasts C2C12 control i de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 mitjançant l'ús de l'antioxidant EUK-207. Experiment representatiu de l'anàlisi morfològic de miotubs obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans de Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 utilitzant 1µM de l'antioxidant EUK-207, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Barra d'escala 200µm.

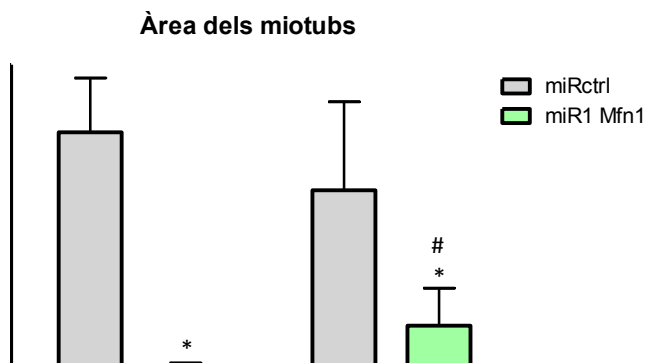


Figura 112. Determinació de l'àrea dels miotubs a Dia 4 obtinguts a partir de mioblasts C2C12 control o de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 amb o sense tractament de l'antioxidant EUK-207. El gràfic mostra la mitjana i l'error estàndard de 2 experiments independents de miotubs obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 utilitzant 0 μ M (NT) o 1 μ M de l'antioxidant EUK-207, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. *mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte el control obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució. #mostra diferències estadísticament significatives amb $p < 0,05$ respecte el miR1 Mfn1 (NT) obtingudes mitjançant una t d'Student amb dues cues de distribució.

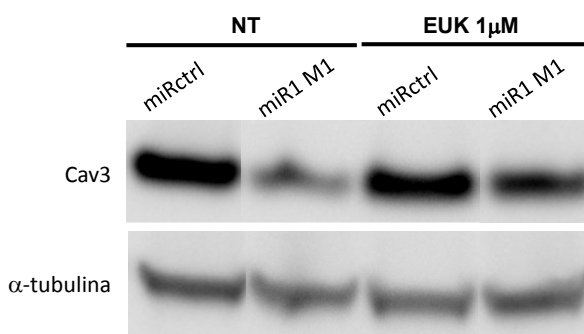


Figura 113. Determinació dels nivells de proteïna de Cav3 en miotubs C2C12 control i en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1 amb o sense tractament de l'antioxidant EUK-207 a Dia 4 de diferenciació. Anàlisi per *Western Blot* de Cav3 en miotubs C2C12 obtinguts a partir de mioblasts C2C12 transduïts 48h abans del Dia 0 amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1 utilitzant 0 μ M o 1 μ M de l'antioxidant EUK-207, diferenciats a partir de Dia 0 i analitzats a Dia 4. Experiment únic, obtingut a partir de 40 μ g de proteïna provinents de lisats totals de miotubs C2C12.

4.2.6 Generació, validació i fenotip de la repressió parcial de la proteïna Mfn1 en múscul esquelètic de ratolí

A partir dels resultats observats en els mioblasts i miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn1, es va decidir estudiar els efectes de la pèrdua de funció de Mfn1 en un model de miogènesi *'in vivo'*. D'aquesta manera, es va utilitzar un model de regeneració muscular mitjançant la inducció d'una lesió produïda per la injecció intramuscular de cardiotoxina (CTX), una toxina procedent d'un verí

de serp que degrada la massa muscular, a ratolins C57BL/6J de 12 setmanes d'edat. Transcorreguts dos dies des de la lesió muscular, les cèl·lules del sistema inflamatori han finalitzat la seva funció de degradació del teixit danyat, deixant pas a la proliferació de les cèl·lules satèl·lit. En aquest moment, es van inocular els adenovirus codificants de miRNA control o de Mfn1, per tal de transduir el màxim número de cèl·lules satèl·lit proliferants. A partir d'aquí, es van prendre mostres a diferents temps (dia 9, 12 i 22 després de la lesió amb cardiotoxina) per avaluar el procés de regeneració muscular mitjançant tècniques histològiques (Figura 59). Prèviament a l'extracció de les diferents mostres, es va comprovar mitjançant l'IVIS (*In vivo Imaging System*) l'expressió de la GFP, ja que ens indicava si els miRNA s'estaven expressant en les cèl·lules del múscul gastrocnemi (Figura 60).

Mitjançant la tinció Hematoxilina-Eosina (H&E), s'ha pogut comprovar que els músculs de ratolins danyats per la CTX amb pèrdua de funció de Opa1 a dia 22 post-injecció (p.i) de la CTX no estan recuperats i que els ratolins control, en aquest mateix moment, segueixen un procés normal de recuperació, encara que el període de regeneració encara no ha finalitzat del tot. De fet, en els ratolins danyats per la CTX amb pèrdua de funció d'Opa1 encara s'observen zones necròtiques i fibroses (Figura 114).

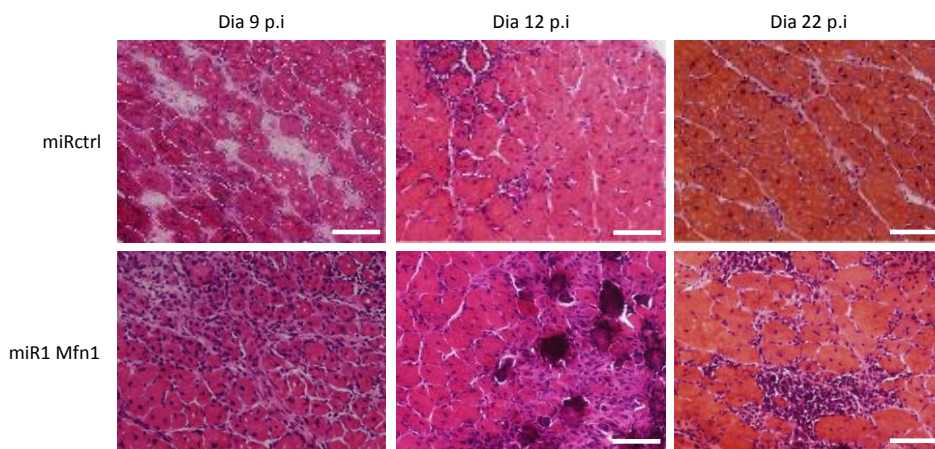


Figura 114. Tinció Hematoxilina-Eosina de múscul esquelètic de ratolins Wt danyats per la CTX i transduïts amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1. Experiment representatiu d'una tinció H&E de talls transversals de múscul gastrocnemi de ratolins de 3 mesos d'edat, danyats mitjançant l'ús de la CTX i transduïts posteriorment amb un adenovirus control o amb un adenovirus amb dos miRNA contra Mfn1. Les mostres es van extreure a diferents dies després de la lesió inicial amb la CTX (a Dia 9, 12 i 22). Barra d'escala 100 μ m. Tinció realitzada per la Dra M^a Àngels Díaz.

DISCUSSIÓ

5 DISCUSSIÓ

El nostre grup ha estudiat el paper de la dinàmica mitocondrial en els últims anys. Concretament, s'ha demostrat que una disfunció causada per un desequilibri entre els processos de fusió i fissió mitocondrials està estretament vinculada a alteracions metabòliques i al desenvolupament de la resistència a la insulina i la obesitat (Bach et al. 2003; Bach et al. 2005; Sebastián et al. 2012; Hernández-Alvarez et al. 2013; Schneeberger et al. 2013). A més, subjectes obesos i diabètics presenten una reducció notable en els nivells de Mfn2 en múscul esquelètic (Hernandez-Alvarez, et al. 2010).

A més, existeix una modulació tant de les proteïnes de fusió mitocondrial (Mfn1, Mfn2 i Opa1) com de les de fissió mitocondrial (Drp1 i Fis1) durant la diferenciació miogènica (Tesi Doctoral Marc Liesa, 2008), suggerint que les proteïnes de dinàmica mitocondrial podrien estar desenvolupant un paper important durant la miogènesi. En aquest sentit, s'ha demostrat que la pèrdua de funció de la proteïna de fusió mitocondrial Mfn2 durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 causa un increment en l'expressió de marcadors de fibres de contracció ràpida i de l'homeòstasi del calci, indicant que Mfn2 podria estar actuant com a modulador de la biogènesi (Tesi Doctoral Marc Liesa, 2008). Per una altra banda, també s'ha demostrat que Mfn2 participa en el control del metabolisme mitocondrial, on miotubs C2C12 deficients per Mfn2 tenen una disminució en el potencial de membrana mitocondrial (Tesi Doctoral Jessica Segalés, 2011) i una respiració no acoblada a la síntesi d'ATP més alta respecte als miotubs control (Segalés et al. 2013). Per tant, això ens va fer pensar que, Opa1 i Mfn1, les altres dos proteïnes involucrades en la fusió mitocondrial, podrien tenir un paper rellevant tant en la diferenciació com en el metabolisme mitocondrial en cèl·lules musculars C2C12. Aquestes, es van

estudiar separatament, ja que la fusió mitocondrial es un procés que es desenvolupa en dos passos, en els que la membrana mitocondrial externa i la interna es fusionen de manera independent (Malka et al. 2005). Aquest procés, es pot explicar degut a què les principals proteïnes responsables de la fusió tenen diferents sublocalitzacions mitocondrials, on la Mfn1 i la Mfn2 estan localitzades a la membrana mitocondrial externa i, Opa1, a la membrana mitocondrial interna.

5.1 Efectes de la repressió de Opa1 i Mfn1 sobre la morfologia i funció mitocondrial

Mitjançant la transducció de mioblasts C2C12 amb adenovirus que codifiquen per 2 miRNAs específics contra la seqüència de Opa1 o Mfn1 de ratolí, es va aconseguir reprimir l'expressió de Opa1 i Mfn1 entre un 70 i un 80%, tant a nivell de mRNA com de proteïna. També es va confirmar que la morfologia de la xarxa mitocondrial en mioblasts deficients per aquestes dues proteïnes estava fragmentada, quan els mioblasts control mostren una xarxa mitocondrial interconnectada. A més, a través d'estudis de fusió mitocondrial utilitzant la mtPA-GFP, es va comprovar que la pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 en mioblasts C2C12 incapacitava parcialment a les mitocòndries a fusionar correctament. De fet, el procés de fusió mitocondrial és 5 cops més lent en comparació amb els mioblasts control.

Estudiant la funció mitocondrial en mioblasts C2C12 deficients per Opa1 o Mfn1, no vam observar canvis significatius en els nivells del mtDNA, tot i que si vam veure una tendència a que estiguessin augmentats. També es va valorar l'efecte de la deficiència de Opa1 sobre les altres proteïnes involucrades en la dinàmica mitocondrial, on destaca una caiguda d'un 45% en Drp1. En quan al potencial de membrana mitocondrial en mioblasts C2C12 deficients per Opa1,

Mfn1 o Mfn2, es va observar una disminució d'un 30%, 25% i 20%, respectivament. A més, mirant els nivells d'expressió d'algunes subunitats dels diferents complexos en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1, vam apreciar una caiguda en les subunitats dels complexos I, III, IV i V durant la diferenciació miogènica. Si ens fixem en la taxa de consum d'oxigen de mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1, no es van observar diferències en rutina però en canvi, el consum d'oxigen mitocondrial estava més de 4 cops augmentat en el cas de Opa1 i més de 3 cops en el cas de Mfn1 quan es va inhibir l'ATP sintetasa, indicant un *proton leak* augmentat. A més, el consum d'oxigen mitocondrial estava més de 3 cops disminuït en ambdós casos quan es va afegir el desacoblant FCCP, indicant que la capacitat respiratòria màxima estava disminuïda. El desacoblament de la fosforilació oxidativa fa desaparèixer el gradient de protons sense la intervenció de la ATP sintetasa. D'aquesta manera, segueix el transport d'electrons però a un ritme molt més alt, en un intent fracassat de restaurar el gradient de protons oxidant més combustible i bombejant més protons cap a l'exterior de les mitocòndries. L'energia produïda pel transport d'electrons es dissipa en forma de calor enlloc d'utilitzar-se per la síntesi d'ATP. Així doncs, a partir dels valors obtinguts, es van calcular les *Flux Control ratios*, que donen informació sobre el grau d'acoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. Concretament, el *Leak Flux Control Ratio (L/E)* estava molt augmentat, indicant un fort desacoblament. De fet, el consum d'oxigen mitocondrial destinat a la síntesi d'ATP en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 i Mfn1 era de més de 8 cops i més de 2 cops més baixa, respectivament, respecte el control.

Quan la respiració està acoblada a la producció d'ATP, els electrons passen a través de la cadena respiratòria i reaccionen amb l'acceptor final, l'oxigen, per produir aigua. En canvi, quan la producció d'ATP es redueix, el flux d'electrons

s'alenteix i els coenzims reduïts com la ubisemiquinona (QH \cdot), que forma part dels complexos I i III, poden reaccionar directament amb l'oxigen produint anions superòxid i, en conseqüència, H $_2$ O $_2$. Tot i això, es va veure que els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció per Opa1, Mfn1 o Mfn2 produïen un 30%, 13% i 25% menys d'anions superòxid, respectivament. Per tant, es van analitzar nivells de peròxid d'hidrogen en cèl·lules en cultiu, observant un augment en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 (un 26% i un 43%, respectivament) però no per Mfn2. Finalment, es van confirmar els resultats obtinguts analitzant els nivells de peròxid d'hidrogen mitocondrial mitjançant la mitoHyPer, on vam observar un augment tant en mioblasts C2C12 deficients per Opa1 com per Mfn1. No es van trobar canvis en els nivells de carbonilació de proteïnes.

Ha estat àmpliament descrit que l'absència o repressió de Opa1 o Mfn1 dona lloc a una morfologia mitocondrial majoritàriament fragmentada (H. Chen et al. 2003; Cipolat et al. 2004). A més, aquestes dues proteïnes són essencials per dur a terme la fusió mitocondrial completa i observar una xarxa mitocondrial interconnectada, tal i com s'ha demostrat en alguns estudis (Malka et al. 2005; Song et al. 2009). Tot i això, mai s'ha estudiat la taxa de fusió que tenen les mitocòndries deficients en Opa1 o Mfn1 al llarg del temps i, tal i com s'ha demostrat, està molt disminuïda. A més, aquest resultat ens suggereix que l'altre proteïna de fusió mitocondrial, la Mfn2, no és capaç de compensar la deficiència de Mfn1 per dur a terme la fusió mitocondrial de la membrana mitocondrial externa per si sola, tal i com es podia deduir d'un estudi on l'addició de Mfn2 en cèl·lules MEF KO per Mfn1 dona lloc a una fragmentació mitocondrial generalitzada (Cipolat et al. 2004). Recentment, s'ha descrit una nova tècnica que permet mesurar el recanvi proteic mitocondrial mitjançant l'ús de la *MitoTimer*, una proteïna fluorescent dirigida a la matriu mitocondrial

que és sensible al temps (Ferree et al. 2013). Així doncs, es podria observar per microscòpia la distribució de les proteïnes mitocondrials joves i velles, on suposadament en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 presentarien una heterogeneïtat que seria contrària a la que observaríem en els controls, on seria més homogènia (estaria en equilibri), tal i com s'observa en cèl·lules INS1 KD per Opa1 o MEFs KO per Mfn1 i Mfn2 (Ferree et al. 2013).

El mtDNA conté 37 gens, els quals són essencials per a una funció mitocondrial normal. Tretze d'aquests gens, són necessaris per la síntesi d'enzims que participen en la fosforilació oxidativa. La resta, són necessaris per la síntesi de RNA de transferència (tARN) i RNA ribosomal (rARN). Tot i que no vam trobar canvis significatius en els nivells de mtDNA, sí es va observar una tendència a estar augmentats. Inicialment, aquests resultats realitzats en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 ens van sobtar, ja que una disminució en els nivells de mtDNA s'han associat a una disfunció mitocondrial en fibroblasts provinents de ratolins doble KO per Mfn1 i Mfn2 o KO per Opa1 (H. Chen et al. 2010). A més, en el cas de la malaltia ADOA "plus", els pacients mostren múltiples delecions en el mtDNA al múscul esquelètic (Amati-Bonneau et al. 2008; Hudson et al. 2008; Ranieri et al. 2012; Pretegianni et al. 2011). No obstant, recentment s'ha demostrat que això no sempre és així, sinó que depèn de si la deficiència d'aquestes proteïnes és crònica o aguda. Així doncs, estudis en fibroblasts provinents de ratolins KO per Opa1 o doble KO per Mfn1 i Mfn2 mostren una caiguda en el mtDNA però en canvi, si aquestes cèl·lules provenen de ratolins normals (homozigots loxP) i s'indueix puntualment el KO per Opa1 mitjançant un adenovirus Cre, no es veuen canvis en el mtDNA (Cogliati et al. 2013), com és el nostre cas. Un punt interessant a tenir en compte, és que Opa1 presenta diferents isoformes i, les que contenen

l'exó 4b, són necessàries pel manteniment i replicació del mtDNA (Elachouri et al. 2011).

També es va observar que la deficiència de Opa1 causa una caiguda en l'expressió de Drp1. En el cas de Drp1, es podria explicar per un intent de compensació, ja que disminuint la fissió es compensaria parcialment la disminució de la fusió mitocondrial, o bé pel simple fet que un cop ja estan fragmentades i no es poden tornar a fusionar, ja no es necessitaria Drp1 per realitzar la fissió.

Analitzant l'impacte de la repressió de Opa1 i Mfn1 sobre el metabolisme energètic cel·lular, vam observar un increment molt marcat en el consum d'oxigen mitocondrial quan es va inhibir l'ATP sintetasa. A més, en afegir el desacoblant FCCP, aquests mioblasts presentaven una disminució molt marcada en el consum d'oxigen mitocondrial, tal com s'ha vist en altres estudis (H. Chen, Chomyn, and Chan 2005). Així doncs, tant en la *Routine Flux Control Ratio* com en la *Leak Flux Control Ratio* tenim un fort increment. El primer, ens va indicar que aquests mioblasts estaven treballant pràcticament al màxim de la seva capacitat, ja que els mioblasts C2C12 control treballaven en rutina al 32% de la seva capacitat màxima i els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 al 80%. En quan al segon, ens va indicar que la majoria del consum d'oxigen en rutina no estava associat a la producció d'ATP. De fet, en els mioblasts C2C12 control, el consum d'oxigen en rutina associat a la síntesi d'ATP era d'un 5% i en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1, d'un 71% i 47%, respectivament. Aquests resultats ens suggereixen que la repressió de Opa1 o Mfn1 provoquen un fort desacoblament de la cadena de transport d'electrons i la síntesi d'ATP i, per tant, una disminució de l'eficiència de la fosforilació oxidativa. Com a conseqüència d'aquests resultats, es va mirar

la taxa d'acidificació del medi extracel·lular, que ens dona una idea del flux glicolític. Com era d'esperar i degut a la disminució de la síntesi d'ATP mitocondrial, vam observar un augment. No obstant, en termes globals, no hi ha canvis en els nivells de la producció d'ATP (resultats no mostrats, Dra M^{re} Àngels Díaz). Això, ens suggereix que els nivells d'ATP són compensats per vies anapleròtiques. De fet, recentment s'ha demostrat que els músculs esquelètics rics en fibres de contracció ràpida de ratolins heterozigots per Opa1 entrenats per l'exercici, presenten una disminució de la biogènesi mitocondrial respecte als control, però s'adapten i ho compensen millorant la seva capacitat per metabolitzar àcids grassos (Caffin et al. 2013).

Un increment del *proton leak*, porta a una disminució en el potencial de membrana mitocondrial (Brand 2000). En el nostre cas, tant la pèrdua de funció de Opa1 com de Mfn1 anava acompanyada d'una caiguda en el potencial de membrana mitocondrial, fet que podria ser una conseqüència directe del desacoblament entre la cadena respiratòria i la síntesi d'ATP. De fet, la pèrdua de funció de Mfn2 també dona lloc a un augment del *proton leak* (Segalés et al. 2013) i, en conseqüència, a una disminució en el potencial de membrana mitocondrial, tot i que no tan dràstic com en el cas de Opa1 i Mfn1. En el cas de Mfn1 i, sobretot d'Opa1, aquesta disminució en el potencial de membrana ja havia estat observada en altres models cel·lulars, on es correlaciona la fusió mitocondrial amb el potencial de membrana mitocondrial (H. Chen, Chomyn, and Chan 2005; Olichon et al. 2003). També vam observar una caiguda en les subunitats dels complexos I, III, IV i V durant la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1. Això, en part es podria explicar pel fet que algunes subunitats dels complexos I, II i III interaccionen directament Opa1, com és el cas de Ndufa9 (Zanna et al. 2008). També es podria explicar pel fet que la forma de les crestes mitocondrials, que depenen

de Opa1 (Frezza et al. 2006), és clau per la formació dels supercomplexes i la seva estabilitat i l'eficiència de la respiració mitocondrial (Cogliati et al. 2013). Per tant, seria interessant estudiar la organització dels supercomplexes en cèl·lules C2C12 deficientes per Opa1 i Mfn1.

Degut a que els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 tenien un fort desacoblament entre el consum d'oxigen mitocondrial en rutina i el destinat a la producció d'ATP (increment del *proton leak*), es va pensar que, en aquestes circumstàncies, s'estarien produint més anions superòxid a través dels complexos I i III (Criscuolo and Bouillaud 2009). Sorprenentment, es va veure que aquests mioblasts produïen menys anions superòxid, al contrari del que haguéssim esperat, tal i com passa en un estudi en *Drosophila* amb mutació heterozigota per Opa1 (Tang et al. 2009). Això ens va a portar a mirar els nivells de peròxid d'hidrogen en cèl·lules en cultiu, on es observava un augment en els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 però no per Mfn2, tot i que també ho esperàvem per la Mfn2, ja que en miotubs L6E9 amb pèrdua de funció de Mfn2 sí hi ha un augment (Sebastián et al. 2012). Això ens va fer pensar que, o bé que la SOD catalitzava ràpidament el pas d'anions superòxid produïts pel sistema OXPHOS a peròxid d'hidrogen o que aquest peròxid d'hidrogen no provenia dels anions superòxid produïts pel sistema OXPHOS. Mitjançant l'ús de la mitoHyPer, vam observar un augment en el peròxid d'hidrogen mitocondrial en mioblasts C2C12 deficientes per Opa1 o Mfn1, suggerint que és la senyal clau que desencadena la menor diferenciació miogènica d'aquests mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1. A més, es van mirar els nivells de carbonilació de proteïnes per veure el dany oxidatiu general, que està lligat a la pèrdua de funcionalitat proteica, sense observar cap tipus de canvi. Per què cèl·lules musculars deficientes en Opa1, Mfn1 i Mfn2 tenen uns nivells més alts de peròxid d'hidrogen i, en canvi, el

fenotip observat durant la diferenciació miogènica és tant diferent? En primer lloc, és important ressaltar que els estudis de Opa1 i Mfn1 s'han realitzat en mioblasts i, els de Mfn2, en miotubs. En segon lloc, els nivells de peròxid d'hidrogen en miotubs deficients per Mfn2 es van realitzar en lisats totals. En canvi, els de mioblasts deficients per Opa1 i Mfn1 es van analitzar *in vivo*, mesurant específicament els nivells de peròxid d'hidrogen mitocondrial. Finalment, el *proton leak*, és molt més elevat en cèl·lules deficients per Opa1 i Mfn1 que per Mfn2. De fet, el consum d'oxigen en rutina associat a la síntesi d'ATP era d'un 5% en mioblasts C2C12 control i, d'un 71% i 47% en mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 i Mfn1, respectivament. En canvi, el consum d'oxigen en rutina associat a la síntesi d'ATP era d'un 4% en miotubs C2C12 control i d'un 7% en miotubs C2C12 amb pèrdua de funció de Mfn2 (Segalés et al. 2013).

5.2 Efectes de la repressió de Opa1 i Mfn1 sobre la diferenciació miogènica

Per tal de comparar els resultats obtinguts pel Dr Marc Liesa en miotubs C2C12 deficients en Mfn2, es van analitzar els efectes de la deficiència de Opa1 i Mfn1 sobre la miogènesi. A diferència de Mfn2 (Tesi Doctoral Marc Liesa, 2008), es va observar que els mioblasts C2C12 amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 eren incapaçs de diferenciar correctament, tant a nivell morfològic (menys àrea i menys nuclis per miotub) com a nivell de marcadors finals de diferenciació, on destaca una caiguda entre un 60 i un 90% en l'expressió a nivell de mRNA de diferents marcadors finals de diferenciació i d'un 90% en l'expressió a nivell proteic de la Caveolina 3 i la MHC. Tot i la gran novetat d'aquests resultats, recentment s'ha demostrat que la fusió mitocondrial és clau per a la correcta diferenciació dels cardiomiòcits (Kasahara et al. 2013). A més, es va observar

una caiguda tant a nivell d'expressió com d'activitat de dos gens màsters de la diferenciació miogènica, MyoD i Miogenina, els quals són estrictament necessaris per a la correcta diferenciació miogènica i per la formació de la fibra madura (Hasty et al. 1993; Nabeshima et al. 1993; Rawls et al. 1998). Tot i que es va pensar que algun repressor de MyoD estaria impeding la seva unió a les Ebox del promotor de la Miogenina i, per tant, bloquejant la seva expressió, no es van trobar diferències destacables en els diferents repressors de MyoD estudiats.

Buscant el mecanisme pel qual la pèrdua de funció de Opa1 i Mfn1 en cèl·lules C2C12 dona lloc a una menor diferenciació miogènica traduïda en una menor expressió i activitat de MyoD i Miogenina, es va decidir estudiar diferents cascades de senyalització que s'activen degut a alts nivells de peròxid d'hidrogen (Abe and Berk 1998) i, que a la vegada, estan involucrades i són imprescindibles per a dur a terme una correcta diferenciació miogènica. No obstant, no es van trobar diferències en p38, que està involucrada en el procés de diferenciació miogènica (Keren, Tamir, and Bengal 2006; Lluís et al. 2006; Perdiguero et al. 2007); ni en ERK1/2, involucrat en la proliferació dels mioblasts (N. C. Jones et al. 2001); ni en JNK, on encara hi ha certa controvèrsia en el seu paper en la miogènesi (Khurana and Dey 2004; Meriane et al. 2000). En canvi, sí es van trobar canvis en la via de NF- κ B, que també s'activa degut a nivells alts de peròxid d'hidrogen (Takada et al. 2003; Zhou, Johnson, and Rando 2001; Y.-P. Li et al. 2003) i que, a la vegada, és un regulador clau de la retirada del cicle cel·lular i de la diferenciació miogènica (Guttridge et al. 2000; Hayden and Ghosh 2008). Concretament, vam observar una completa degradació específica de l'inhibidor I κ B- β , que reté el complex NF- κ B al citoplasma, i un augment en l'activitat transcripcional del promotor de NF- κ B de més de 3 i 4 cops en mioblasts deficients per Opa1 i Mfn1, respectivament.

Mitjançant l'ús de l'antioxidant NAC, que no només millora la diferenciació miogènica en cèl·lules C2C12 amb nivells excessius de H₂O₂ (Langen et al. 2002) sinó que també rescata la menor diferenciació miogènica deguda a l'activació de NF-κB per excés de peròxid d'hidrogen (Schreck, Rieber, and Baeuerle 1991), no vam aconseguir revertir el fenotip observat en cèl·lules C2C12 deficientes per Opa1 o Mfn1, ja que tot i que millorava la diferenciació miogènica tant morfològicament com a nivell de marcadors bioquímics, també millorava les cèl·lules C2C12 control. En canvi, mitjançant l'ús de dos antioxidants més específics, els complexos de Salen de manganès EUK-134 i EUK-207, que tenen una potent activitat superòxid dismutasa i catalasa (Doctrow et al. 2002), aquestes cèl·lules sí es recuperen i diferencien parcialment a nivell morfològic, traduït en un augment de l'àrea i nombre de nuclis per miotub, encara que s'ha d'estudiar millor en quan a l'expressió de marcadors bioquímics. Tot i això, aquests miotubs no arriben a ser tan llargs i gruixuts com en el cas dels miotubs C2C12 control.

Agafant tots aquests resultats conjuntament, suggerim que Opa1 i Mfn1 són essencials en el control de la funció mitocondrial en cèl·lules musculars '*in vitro*'. A més, tenint en compte que els defectes observats en cèl·lules deficientes per Opa1 o Mfn1 durant la miogènesi són parcialment normalitzats mitjançant l'ús d'antioxidants específics, ens indiquen que la disfunció mitocondrial podria ser rellevant en algunes de les alteracions detectades en la formació dels miotubs. Així doncs, s'ha demostrat que:

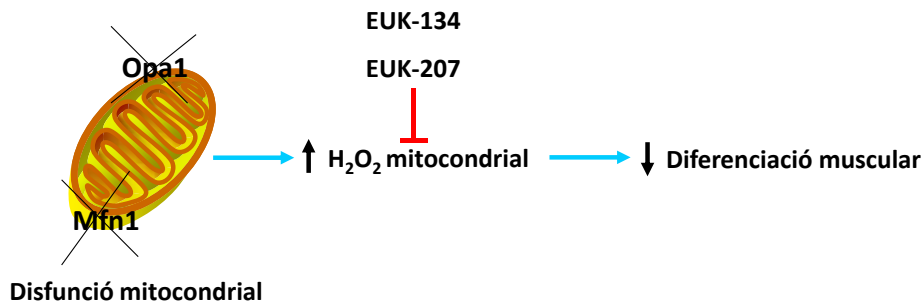


Figura 115. Model on es mostra que la pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 en cèl·lules C2C12 causa una menor diferenciació miogènica. La pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 en mioblasts C2C12 provoca una disfunció mitocondrial. Aquesta situació, causa un augment dels nivells de peròxid d'hidrogen mitocondrial, que condueixen a una menor diferenciació muscular. L'ús dels antioxidants específics EUK-134 i EUK-207, rescaten parcialment el fenotip morfològic, millorant la llargada i el gruix dels mitotubs.

I a la vegada, proposem com a possible mecanisme el següent model:

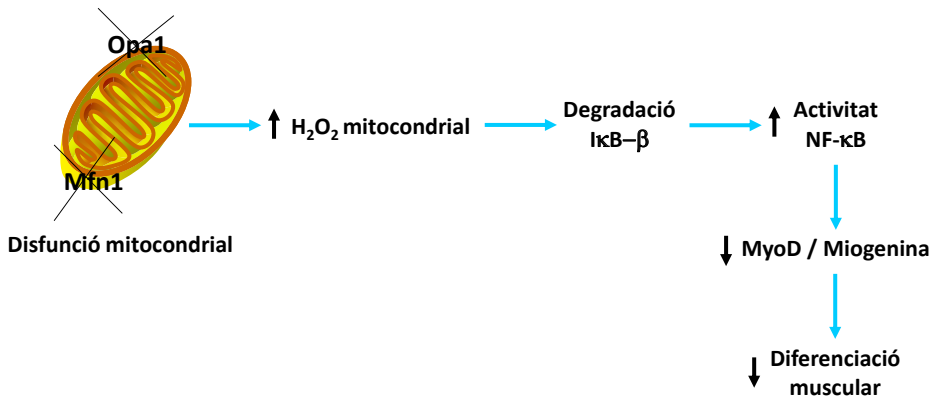


Figura 116. Model proposat pel qual la pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 en cèl·lules C2C12 condueix a una menor diferenciació miogènica. La pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 en mioblasts C2C12 provoca un augment del *proton leak* i, en conseqüència, un desacoblament del sistema OXPHOS. Aquesta situació, provoca un augment dels nivells de peròxid d'hidrogen mitocondrial, que a la vegada produeixen una modificació post-traducciona en el complex NF-κB. De fet, el peròxid d'hidrogen activa el complex IKK, que fosforila a IκB-β i aleshores es sotmès a ubiquitinizació i degradació proteasòmica. Un cop alliberat l'inhibidor, els dímers de NF-κB es transloquen al nucli, on s'uneixen a gens diana i estimulen la seva transcripció. L'activació de NF-κB, provocaria la desestabilització de l'mRNA de MyoD, provocant una menor expressió i activació d'aquest. Seguidament, una menor activitat de MyoD causa una menor expressió de

Miogenina, que és imprescindible per a la correcta diferenciació miogènica i per a la formació d'una fibra madura.

5.3 Efectes de la repressió de Opa1 i Mfn1 en múscul esquelètic

A partir d'aquests resultats *'in vitro'*, es va donar un pas més enllà reprimint parcialment les proteïnes Opa1 i Mfn1 en múscul esquelètic de ratolí, per veure la capacitat de regeneració muscular mitjançant la inducció de lesió produïda per la injecció intramuscular de CTX (Mann et al. 2011). El múscul esquelètic té una gran capacitat per respondre a una lesió. L'ús d'aquesta tècnica, permet observar, en primer lloc, una fase degenerativa, seguida d'una fase regenerativa. En la fase degenerativa, després de la injecció de CTX, es produeix una ràpida necrosi de les miofibres i l'activació de la resposta inflamatòria, que porta a la pèrdua de l'arquitectura muscular. La fase regenerativa, es caracteritza per l'activació de les cèl·lules satèl·lit, que proliferen i es diferencien per formar noves fibres. En aquest mateix moment, que succeeix aproximadament al cap de dos dies de la lesió inicial de CTX, és quan també la resposta inflamatòria comença a disminuir. Per això, en aquest punt, és quan fem la segona injecció amb els adenovirus recombinants, per tal de transduir el màxim nombre de cèl·lules satèl·lit proliferants i les mínimes del sistema inflamatori. Els resultats obtinguts, mostren que els músculs de ratolins danyats per la CTX amb pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 a dia 22 post-injecció inicial de la CTX no estan recuperats i que els ratolins control, en aquest mateix moment, segueixen un procés normal de recuperació, encara que el període de regeneració encara no ha finalitzat del tot. De fet, en els ratolins danyats per la CTX amb pèrdua de funció d'Opa1 o Mfn1 encara s'observen zones necròtiques

i fibroses. Aquest resultat ens suggereix que Opa1 i Mfn1 són proteïnes importants per a la correcta activació i diferenciació de les cèl·lules satèl·lit.

Finalment, es va generar el ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic. Cal destacar que, a nivell fenotípic, aquest ratolí és molt més petit que el control. Com a dada interessant, aquests ratolins viuen un màxim de 30 setmanes (resultats no mostrats, Dra M^a Àngels Diaz), tal i com s'ha vist de manera similar en un estudi en *Drosophila* amb mutació heterozigota per Opa1 (Tang et al. 2009). A més, la majoria d'aquests ratolins presenten quifosi i cataractes. Aquests resultats, entre d'altres, ens suggereixen que la repressió de Opa1 específicament a múscul esquelètic dona lloc a una miopatia, una reducció en el creixement del múscul i una disminuïda longevitat, contràriament als resultats obtinguts amb el ratolí KO per Mfn2 específic de múscul esquelètic, on el fenotip observat no presenta cap d'aquestes característiques (Sebastián et al. 2012). De manera interessant, un estudi en ratolins KO totals per Ndufs4 (Subunitat del complex I), mostren un fenotip amb certes similituds al nostre, ja que presenten una reducció en el creixement, ceguera, pèrdua de les habilitats motores i una disminuïda longevitat (Kruse et al. 2008). Això ens suggereix que Opa1 podria estar actuant *upstream* de la subunitat Ndufs4 del complex I.

CONCLUSIONS

6 CONCLUSIONS

- 1) La pèrdua de funció de Opa1 o Mfn1 en mioblasts C2C12 provoca una reducció de la fusió mitocondrial, així com disfunció mitocondrial. Aquesta es caracteritza per un augment del *Proton Leak*, i de la producció mitocondrial de peròxid d'hidrogen. A més, hi ha una reducció de subunitats dels complexos I, III, IV i V durant la miogènesi.
- 2) La repressió de Opa1 o Mfn1 en cèl·lules C2C12 bloqueja la diferenciació miogènica a través d'una disminució en l'activitat i expressió dels gens màster de la miogènesi MyoD i Miogenina.
- 3) La repressió parcial de Opa1 o Mfn1 en cèl·lules satèl·lit de múscul esquelètic de ratolins un cop s'ha produït lesió en les fibres musculars, alenteix el procés de regeneració muscular. Aquestes dades recolzen el paper crucial de Opa1 i Mfn1 en la correcta activació i diferenciació de les cèl·lules satèl·lit musculars.
- 4) L'ús d'antioxidants específics (EUK-134 i EUK-207) rescata parcialment la diferenciació miogènica a nivell morfològic. Això suggereix que la disfunció mitocondrial i l'augmentada producció de peròxid d'hidrogen juguen un paper rellevant en les alteracions de la miogènesi.
- 5) La repressió de Opa1 o Mfn1 en mioblasts C2C12 augmenta l'activitat de NF- κ B mitjançant la degradació específica de l'inhibidor I κ B- β . Aquestes dades indiquen l'existència d'una connexió entre deficiència en Mfn1 i Opa1, i estimulació de l'activitat pro-inflamatòria cel·lular, i podrien explicar les alteracions en la diferenciació miogènica.
- 6) El ratolí KO de la proteïna Opa1 específic de múscul esquelètic dona lloc a miopatia, reducció en el creixement del múscul i disminuïda longevitat. Això indica addicionalment el paper crucial de Opa1 en el control de la biologia muscular.

MATERIALS I MÈTODES

7 MATERIALS I MÈTODES

7.1 Cultius cel·lulars

Un dels punts més crítics quan es treballa amb cultius cel·lulars és la contaminació biològica. Els contaminants més comuns són microorganismes bacterians, micoplasmes i fongs, que afecten a la integritat de les cèl·lules en cultiu i a la seva fisiologia. Per tant, per tal d'evitar una contaminació, és estrictament necessari treballar en condicions de màxima esterilitat, ja que tots aquests microorganismes són presents a l'ambient. Així doncs, es treballa amb materials i reactius estèrils dins d'una campana de flux laminar, la qual aporta una atmosfera de treball sense contaminants.

En funció de la naturalesa dels diferents materials, s'han utilitzat diferents mètodes d'esterilització: autoclau (120°C durant 20 minuts), filtració (filtres amb un diàmetre de porus de 0,22µm), rajos ultravioletes (UV), etc. No obstant, en el cas de materials sòlids no autoclavables d'un sol ús (plaques, flascons, etc.) o de líquids (medis, sèrum, etc.), es compren directament estèrils a les diferents cases comercials.

7.1.1 Línies cel·lulars

S'han utilitzat dues línies cel·lulars en aquesta tesi: les C2C12 i les HEK293A. Ambdues creixen adherides en plaques o flascons en cultiu i s'incuben a 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% CO₂ per mantenir el pH del medi. L'incubador utilitzat ha estat el *Thermo Electron Corporation, Forma Series II, Water Jacketed CO2 Incubator, HEPA class 100 filter, Model 3121*.

-C2C12: és una línia cel·lular generada per Blau i col·laboradors a partir de mioblasts C2 obtinguts originalment per Yaffe i Saxel a través de diversos passes de mioblasts en cultiu, derivats de cèl·lules satèl·lit de ratolí C3H. Estan disponibles a l'ATCC (*American Type Culture Collection*) i és una línia cel·lular immortalitzada. A més, tenen la capacitat de diferenciar a miotubs multinucleats. Aquesta diferenciació és ràpida i en alguns experiments es pot inclús observar la contracció espontània. Tenen un temps de duplicació menor a 24 hores. Aquesta és la línia cel·lular que s'ha utilitzat en pràcticament tots els experiments realitzats.

-HEK 293A (*Human Embryonary Kidney 293*): és una línia cel·lular d'origen humà. Aquestes cèl·lules estan transformades degut a la infecció amb l'adenovirus 5 humà, que causa varies mutacions provocades per la inserció del genoma adenoviral. Únicament s'han utilitzat perquè poden amplificar adenovirus recombinants. Als adenovirus recombinants, per motius de bioseguretat, els manca una regió del genoma adenovíric que és essencial per la seva replicació o amplificació. Això evita que puguin replicar-se en l'investigador que els manipula o en el model emprat de treball. Per tant, els adenovirus només introduiran episomalment el DNA del seu genoma dins la cèl·lula, sense poder formar partícules víriques noves (procés conegut com a transducció, ja que el terme infecció comporta capacitat de replicació vírica). Aquesta regió mancanta amb els gens essencials per la replicació, la conté el genoma de les HEK293. Per tant, els adenovirus recombinants transduïts en les HEK293 són capaços de replicar-se, ja que el genoma de les HEK293 aporta les proteïnes (*en trans*) que necessiten per proliferar. Tenint en compte això, és important no emprar un nombre massa gran de cèl·lules HEK293 ni d'adenovirus a l'hora d'amplificar-los, ja que d'aquesta manera s'augmenta molt el nombre de probabilitats que tingui lloc una recombinació entre el

genoma de les HEK293 i el víric, generant així adenovirus capaços de replicar i, probablement, amb el transgen d'interès eliminat. La "A" de HEK293A és perquè són adherents, ja que les altres HEK293 es desenganxen molt fàcilment de la placa. Tenen un temps de duplicació menor a 24 hores. °

7.1.2 Medis de cultiu

En aquesta tesi, únicament s'ha utilitzat el medi DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*, de Gibco), que conté 25mM de glucosa i L-glutamina. En aquest medi, se li afegeixen els següents components:

-**Penicil·lina/Streptomicina** (Gibco), a una concentració final de 100U/ml i 100µg/mL, respectivament. Són dos antibiòtics específics contra bacteris.

-**HEPES** (Panreac), a una concentració final de 25mM. La solució *stock* es prepara a 1'25M, a pH 7,4 i s'esterilitza amb filtres de 0,22µm. L'HEPES proporciona al medi un sistema de tamponament.

A més, a l'hora de preparar medi de creixement (tant pel cas de les C2C12 com de les HEK293A), s'afegeix un 10% de sèrum fetal boví (**FBS**, Gibco). L'FBS proporciona al medi tots els factors de creixement i altres molècules necessàries per la proliferació cel·lular. En canvi, per preparar el medi de diferenciació per les C2C12, enlloc de FBS s'hi afegeix un 5% de sèrum de cavall (**HS**, Gibco). Prèviament a l'ús del FBS o del HS, s'ha d'inactivar a 56°C durant 30 minuts.

7.1.3 Subcultius de manteniment

Quan les cèl·lules arriben a la subconfluència (90% confluència) en placa o flascó, es tracten amb una solució estèril de tripsina (enzim proteolític) i EDTA (compost quelant de calci) en PBS (acrònim anglès del tampó fosfat salí pH 7,4,

de Gibco) amb la finalitat de realitzar subcultius. Aquest tractament de proteòlisi enzimàtica i de segrest del calci trenca i desestabilitza els components proteics de la matriu extracel·lular responsables de l'adhesió cèl·lula-placa i cèl·lula-cèl·lula. Això permet obtenir les cèl·lules en suspensió per poder repartir-les o subcultivar-les en diferents plaques o flascons. El protocol del tractament amb tripsina és el següent:

- 1) Aspirar el medi de cultiu de la placa o flascó amb les cèl·lules adherides amb pipetes *pasteur* de vidre.
- 2) Afegir una solució de PBS estèril, normalment amb un volum equivalent o la meitat del volum de medi emprat per créixer les cèl·lules. Aquest pas és molt important perquè l'elevat contingut proteic de l'FBS present en el medi pot reduir molt l'activitat proteolítica de la tripsina per inhibició competitiva.
- 3) Aspirar el PBS.
- 4) Afegir la solució estèril de Tripsina/EDTA en PBS prèviament escalfada a 37°C (ja que sinó no és prou activa). Normalment, s'utilitza una 1/10 part del volum del medi de cultiu emprat per créixer les cèl·lules. Es deixa la placa a l'incubador (37°C, 5% CO₂) durant 5 minuts .
- 5) Després dels 5 minuts, s'afegeix medi fresc de cultiu a la placa amb la tripsina i es recullen les cèl·lules (es puja i es baixa amb el pipetejador la suspensió cel·lular uns 6 cops perquè sigui ben homogènia i per acabar de desenganxar les cèl·lules adherides dèbilment a la placa).
- 6) Es centrifuga la suspensió cel·lular 5 minuts a 1400rpm, s'aspira el sobrenedant per eliminar el medi amb tripsina (tot i que està inactiva) i es resuspenen les cèl·lules amb medi fresc.

Amb aquesta suspensió de cèl·lules es realitzen els comptatges al microscopi amb la cambra de *Neubauer* i es fan les corresponents dilucions per fer

subcultius en plaques o flascons. És important repartir bé la suspensió per tota la placa o flascó i que sigui ben homogènia. D'aquesta manera les cèl·lules creixen separades unes de les altres i s'evita la inhibició de la proliferació per contacte cèl·lula-cèl·lula.

7.1.4 Congelació/Descongelació de cèl·lules

La congelació de cèl·lules és un procediment imprescindible, ja que permet tenir un *stock* de cèl·lules òptimes. A més, a mesura que es creixen les cèl·lules i es fan subcultius, aquestes cèl·lules acumulen mutacions que amb el temps fa que acabin tenint propietats estranyes o no desitjades com per exemple, problemes per diferenciar correctament. També és important tenir un *stock* "net" controlat per si hi ha una contaminació, descartar-ho tot i poder tenir cèl·lules no contaminades. El protocol de congelació és el següent:

- 1) Es tracta amb tripsina una placa subconfluent de 56cm² i s'obtenen les cèl·lules en suspensió.
- 2) Es centrifuga la suspensió a 1400rpm, 5 minuts, en una centrífuga *Beckman Coulter Allegra 31*.
- 3) S'aspira el medi i es resuspenen suaument les cèl·lules en 5ml de FBS amb DMSO estèril al 10%. És molt important que la solució de FBS amb 10% DMSO estigui freda (en gel).
- 4) S'afegeix 1ml de la suspensió per cada criotub (Nunc) col·locat en el *StrataCooler* fred (en gel també). Prèviament, en els criotubs, s'ha anotat el tipus cel·lular, la data, el nombre de cops que han estat subcultivades les cèl·lules (conegut també com nombre de passes) i el nom de l'investigador responsable si s'escau.
- 5) Es diposita l'*StrataCooler* (tanc de isopropanol) amb els criotubs al congelador de -80°C i es deixa tota la nit, permetent la congelació gradual de

les cèl·lules. Al dia següent es poden treure els vials de l'*StrataCooler* i guardar-los en un tanc de nitrogen líquid (mantenint-se de manera òptima durant anys). També es poden conservar durant mesos al congelador de -80°C. L'ús de l'*StrataCooler* és molt important ja que l'isopropanol permet la congelació gradual, evitant la formació de cristalls que afectarien a la viabilitat.

Per una altra banda, el procés de descongelació també s'ha de controlar perquè el DMSO al 10% a temperatura ambient és tòxic per les cèl·lules. Amb això, el protocol de descongelació és el següent:

- 1) Es prepara un tub Falcon amb 10ml de medi de creixement a la campana de flux laminar i escalfat prèviament a 37°C.
- 2) Es descongela el vial durant 1 minut al bany de 37°C però sense deixar-lo descongelar del tot.
- 3) Es recull el contingut del vial amb una pipeta de 1ml i es barreja amb el medi de creixement que hi ha en el tub Falcon.
- 4) Es centrifuga la suspensió cel·lular durant 5 minuts 1400rpm a la centrífuga *Beckman Coulter Allegra 31*.
- 5) Immediatament, s'aspira el sobrenedant i es resuspèn el precipitat cel·lular amb medi de creixement fresc, el volum del qual depèn de la superfície de la placa o flascó on es creixeran les cèl·lules.

7.1.5 Comptatge de cèl·lules

El comptatge de cèl·lules molts cops és necessari per assegurar-nos que partim un experiment sota les mateixes condicions. Aquest comptatge, el realitzem mitjançant la cambra de *Neubauer*, seguint el següent protocol:

- 1) Després de tractar amb tripsina les cèl·lules, s'agafa una alíquota de la suspensió cel·lular quan està ben homogènia i es diposita en un tub *ependorf*.
- 2) Amb una micropipeta de 20µl (*Pipetman* de Gilson) s'afegeixen 10µl de la suspensió cel·lular entre la cambra de Neubauer (*Neubauer improved* de Brand Gmbh) i un cobreobjectes (Menzel-Glaser, 24x50mm), evitant fer bombolles. Degut a la profunditat (0,1mm), la superfície coneguda de la cambra i el volum exacte de suspensió afegit, és possible conèixer el nombre de cèl·lules per mil·lilitre de suspensió, mitjançant el comptatge de les cèl·lules que entren dins la cambra.
- 3) Es visualitzen les cèl·lules dins la càmera de Neubauer amb un microscopi vertical de camp clar Nikon Eclipse TS100 a 4x i 10x augments. La càmera de Neubauer és un quadrat de 3 x 3mm, en el qual hi ha 4 quadrants d'1 x 1mm, els quals estan dividits en 16 quadrats de 0,25 x 0,25mm. Amb això, es compta el nombre total de cèl·lules que cauen dins de cada quadrant d' 1 x 1mm i es fa la mitjana dels 4 valors de cada quadrant. Tenint en compte el volum de la cambra i el volum de la suspensió cel·lular comptada, per obtenir el nombre de cèl·lules per mil·lilitre de la suspensió, es multiplica la mitjana dels 4 valors obtinguts per 10⁴. Normalment, aquest comptatge es realitza per duplicat.

7.1.6 Detecció de micoplasma

A diferència dels fongs o dels bacteris, el micoplasma és un contaminant biològic que no es pot veure al microscopi. Un comportament anormal de les cèl·lules (disminució de la taxa de duplicació, pèrdua d'adherència a la placa, disminució de l'eficiència de transfecció, etc) pot ser indicatiu de la presència de micoplasma. Amb tot això, cal una metodologia de detecció específica per a aquest paràsit. En aquesta tesi, s'ha emprat el mètode *EZ-PCR Mycoplasma Test Kit* (Biological, Industries Co.), que consisteix en la detecció i amplificació per PCR del genoma del paràsit a partir d'una mostra d' 1ml de medi de

creixement (que hagi estat en contacte amb les cèl·lules un mínim de 48 hores). En el cas que el resultat positiu i no es puguin descartar les cèl·lules, hi ha tractaments químics específics per matar el paràsit.

7.1.7 Transfecció de cèl·lules

El procés de introducció d'DNA exogen per mètodes químics en cèl·lules eucariotes és conegut com a transfecció. Aquesta introducció permet sobreexpressar proteïnes per veure la seva activitat sobre diferents paràmetres biològics o fer estudis d'activació de promotors, entre altres utilitats. Per realitzar-la, s'ha utilitzat la Lipofectamina 2000 (Life technologies).

La Lipofectamina 2000 és un lípid catiònic que forma complexes amb el DNA mitjançant càrregues electrostàtiques. Aquest lípids són capaços de provocar l'entrada del DNA exogen dins la cèl·lula de manera eficient. El procés detallat o la fórmula química del compost no és de domini públic degut a què és un producte comercial. Aquest mètode s'ha emprat concretament per la transfecció de mioblasts C2C12 per a realitzar assaigs luciferasa i per a realitzar assaigs per mesurar la taxa de fusió mitocondrial, ja que permet transfeccions amb eficiències reproduïbles. També s'ha emprat per a la producció d'adenovirus recombinants en HEK293A, on s'hi transfectava el vector adenovíric lineal de 37 kilobases.

Els punts claus d'aquest mètode de transfecció són els següents: la relació $\mu\text{g DNA} : \mu\text{l Lipofectamina}$, que és clau per l'eficiència de transfecció i pot variar segons el tipus cel·lular. Tant per les C2C12 com per les HEK293A, aquesta relació va ser de $1\mu\text{g DNA} : 3\mu\text{l Lipofectamina 2000}$. L'altre punt clau és el requeriment de l'absència d'antibiòtics en el medi mentre les cèl·lules estan en presència de Lipofectamina 2000, ja que pot provocar l'entrada d'aquests dins

la cèl·lula, amb la seva conseqüent toxicitat. Per la resta, es van seguir les indicacions del protocol subministrat per la casa comercial (quantitats d'DNA per placa, temps d'incubació...). En el cas de les HEK293A, el protocol està explicat en l'apartat de generació i amplificació d'adenovirus.

7.1.8 Producció i amplificació d'adenovirus recombinants

Per a generar els adenovirus recombinants, es va decidir utilitzar la clonació per recombinació amb el sistema *Gateway*, de Life technologies. Mitjançant aquest sistema s'han generat 10 adenovirus diferents al laboratori (miR control, miR1 Opa1, miR2 Opa1, miR1 Mfn1 i miR2 Mfn1, tots amb i sense la EmGFP).

La generació dels adenovirus consisteix en la transfecció del vector adenoviral lineal obtingut a les cèl·lules HEK293A, que tenen la capacitat de generar adenovirus recombinants. El protocol de transfecció és el següent (tot es realitza en la campana de flux laminar, amb material estèril i en nivell de bioseguretat 2):

- 1) Un dia abans de la transfecció, es subcultiven 5×10^5 HEK293A en un pou d'una placa de 6 pous (50% de confluència). D'aquesta manera el dia de la transfecció estaran proliferant de manera activa, cosa que afavoreix la transfecció.
- 2) El dia de la transfecció es barregen 250µl de DMEM sol amb 1µg del vector adenoviral lineal i, en un altre tub eppendorf, es barregen 250µl de DMEM sol amb 3µl de Lipofectamina 2000. Es barreja bé el DMEM+Lipofectamina 2000 per agitació manual de l'eppendorf (donant copets a la paret del tub). Es deixa aquesta última barreja màxim durant 5 minuts a temperatura ambient.
- 3) Després dels 5 minuts s'afegeixen els 250µl de DMEM + 1µg del vector adenoviral lineal en el tub amb 250µl de DMEM + 3µl de Lipofectamina 2000.

S'agita manualment també, ja que la naturalesa hidrofòbica de la Lipofectamina 2000 fa que tingui afinitat pel plàstic de les puntes de les micropipetes. Posteriorment, es deixa 20 minuts a temperatura ambient perquè es formin els complexos DNA-Lipofectamina.

4) Durant els 20 minuts del pas 3, s'aspiren els medis dels subcultius a transfectar realitzats el dia anterior (que estaran a un 95% de confluència) i se'ls hi afegeix 1,5ml de DMEM amb 10% FBS però sense antibiòtics.

5) Passats els 20 minuts, es barreja bé la solució manualment i s'afegeixen els 500µl de la solució amb la Lipofectamina 2000 (pot ser que sigui tèrbola pels complexos), gota a gota, al pou amb les HEK293A, mentre la placa es mou verticalment i horitzontalment (fent forma de creu, per repartir bé els precipitats). Es deixa durant 6h aquesta solució a l'incubador de 37°C i 5% de CO₂.

6) Aleshores, es realitza un rentat amb PBS per eliminar el medi amb la solució de transfecció i s'afegeixen 2ml de medi fresc de creixement.

7) A les 48 hores, si la construcció vírica codifica per una proteïna fluorescent (GFP) es pot observar, al microscopi de fluorescència (filtre FITC), que el percentatge de transfecció és molt baix (de l'ordre de l'1%). Aquest fet és normal, ja que els vectors de gran tamany presenten eficiències de transfecció molt baixes, i el vector adenoviral lineal té unes 32 kilobases. En aquest moment, les cèl·lules estan molt confluents. Amb això, s'han de tractar amb tripsina i afegir-les totes a una placa de 56cm² (amb medi de creixement fresc). Un cop a la placa de 56cm², s'ha d'esperar entre 8 i 22 dies perquè es produeixin els adenovirus (el rang de dies més habitual és entre 10 i 13). Es va canviant el medi de creixement cada 2-3 dies fins que s'observin els primers signes evidents de producció de virus (en aquest moment, ja no es tornarà a canviar més el medi).

8) La producció de virus es fa patent per l'anomenat efecte citopàtic de les HEK293A (o CPE de l'acrònim en anglès). Els adenovirus tenen un cicle de reproducció lític, és a dir, es sintetitzen en el citoplasma de la cèl·lula fins que el seu acúmul excessiu fa que la cèl·lula rebenti i s'alliberin els virus al medi. Així doncs, en l'etapa inicial de la infecció o de generació d'adenovirus en les HEK293A, aquestes s'enfosqueixen i presenten una intensa granulació anormal. En aquest moment, encara se'ls pot seguir canviant el medi i s'ha de continuar esperant.

9) La segona fase es dona en el moment que les HEK293A ja estan molt plenes de virus. Això provoca que s'arrodoneixin i es desenganxin de la placa, formant estructures esfèriques refringents agrupades, molt similars al raïm, que suren. Aquest és l'estat en el qual les cèl·lules tenen una major quantitat de virus i que és conegut com a CPE. En aquest moment no s'ha de canviar el medi, ja que perdríem cèl·lules surant plenes de virus. Quan el 80%-90% de les HEK293A presenten CPE, es recull tot el medi amb les cèl·lules i es dipositen en un tub de 15ml (Corning o Nunc). Tant si es recull massa d'hora (poc % de CPE), com massa tard, pot causar la reducció del nombre de virus obtingut en la preparació. Si es recull massa tard, hi haurà més lisi cel·lular i els adenovirus alliberats al medi per lisi cel·lular s'inactiven per dos motius: perquè són menys estables en el medi que en l'interior cel·lular i perquè s'inactiven a la temperatura de creixement de les cèl·lules (37°C).

10) Un cop s'ha recollit el medi i les cèl·lules de la placa de 56cm², per alliberar els virus de l'interior de les HEK293A s'han de realitzar cicles de congelació i descongelació (per lisar la membrana cel·lular). Això es porta a terme amb tres cicles de congelació a -80°C durant 30 minuts i descongelació de 15 minuts a 37°C. És important no excedir els 15 minuts a 37°C per 10ml de volum, ja que és el temps just per descongelar 10ml sense arribar a la temperatura de 37°C, que inactiva els virus.

11) Un cop fet l'últim cicle, es centrifuga el lisat de HEK293A amb els virus alliberats al medi a 3000rpm durant 5 minuts a temperatura ambient (Beckmann Coulter Allegra 31), separant les restes cel·lulars del sobrenedant amb virus. Posteriorment, es filtra el sobrenedant amb un filtre de 0,45µm de diàmetre de porus (Schleicher & Schuell), per eliminar qualsevol resta cel·lular que no s'hagi descartat amb la centrifugació.

Aquest sobrenedant es reparteix en criotubs, en alíquotes d' 1ml, i serà el que anomenarem *stock* viral cru. Aquests adenovirus només s'utilitzaran per amplificar. D'aquesta manera tindrem un *stock* de virus pur i original al qual recórrer en cas de qualsevol problema. S'emmagatzemen a -80°C i a l'hora d'emprar-los i descongelar-los sempre es mantenen en gel.

Per amplificar els adenovirus, simplement es necessiten 100µl de l'*stock* viral cru, els quals s'afegeixen a una placa de 56cm² amb HEK293A al 95% de confluència (subcultivada el dia anterior al 45-50% de confluència), gota a gota i agitant la placa en cercles. Normalment, entre 24-48 hores, ja hi ha un 90% de HEK293A amb efecte citopàtic (CPE). Aleshores es repeteixen els passos del 9 a 11 i s'obtenen virus que podran ser emprats per realitzar transduccions de diferents línies cel·lulars. Mitjançant aquesta amplificació, es poden obtenir quantitats de virus suficients com per treballar amb línies cel·lulars. Es poden realitzar amplificacions amb un major nombre de cèl·lules i volums d'*stock* cru per obtenir un major nombre d'adenovirus. Això és necessari en el cas que s'hagin de purificar els adenovirus, que és obligatori si es volen injectar adenovirus per via venosa a ratolins o utilitzar-los en línies cel·lulars més sensibles. Normalment, 5 plaques de 145cm² són suficients per obtenir prou virus com per poder ser purificats a títols elevats.

7.1.9 Titulació d'adenovirus recombinants

Hi ha diversos mètodes per a la titulació d'adenovirus d'una preparació. En aquesta tesi, s'ha utilitzat un kit comercial, l'*Adeno-XTM Rapid Titer Kit* (PT3651-2, Clontech), on s'ha seguit el protocol proporcionat per la casa comercial.

7.1.10 Transducció adenoviral en mioblasts C2C12

Hi ha diferents protocols de transducció adenoviral (per exemple, reduint molt el volum de medi a l'hora d'afegir els virus, sense FBS, etc). En aquesta tesi, s'afegien els virus directament sobre el medi de creixement, es deixaven durant 48 hores i després es rentaven les cèl·lules amb PBS. D'aquesta manera s'han aconseguit transduccions eficients. La transducció dels adenovirus és dependent de l'expressió en la membrana plasmàtica de la proteïna CAR (*Cocksackie-Adenovirus receptor*). Per tant, la sensibilitat a la transducció pot ser diferent dependent del tipus cel·lular. En el nostre cas, s'ha utilitzat una MOI⁵ de 200. MOIs més elevades no són recomanables perquè poden afectar a la diferenciació a miotub. Així doncs i exceptuant alguns experiments puntuals, el protocol a seguir ha estat el següent:

- 1) Es sembren 75000 cèl·lules en un pou d'una placa de 6w, que tenen una àrea de 8'3cm² cada un.
- 2) A les 12h (Dia -2), es canvia el medi i es transdueixen les cèl·lules a 200 MOIs.
- 3) Al cap de 48h (Dia 0), ja estan subconfluent. Aleshores es fa un rentat amb PBS i tot seguit es realitzen els experiments a Dia 0 o bé s'afegeix medi de diferenciació fins a un màxim de Dia 4.

⁵ MOI (Multiplicity of Infection): terme amb el que es coneix el nombre de virus que s'afegeix per cèl·lula. Cal conèixer el títol per saber el volum necessari de la solució vírica a afegir per transduir a un determinat nombre de MOIs.

7.2 Tècniques de Biologia molecular, manipulació i detecció d'àcids nucleics

En aquesta tesi, tot aquest conjunt de tècniques han estat emprades amb tres finalitats:

- 1) Generar els vectors amb els transgens necessaris per realitzar diferents estudis en cèl·lules C2C12.
- 2) Genotipar els ratolins KO de la proteïna Opa1 específics de múscul esquelètic.
- 3) Quantificar els nivells de mRNA per *Real-Time PCR* (que comporta la retrotranscripció del mRNA a cDNA i la posterior quantificació per PCR).

7.2.1 Vectors plasmídics: amplificació i purificació

Els plasmidis són molècules de DNA circular que, gràcies a aquesta circularitat, poden ser introduïts a l'interior dels bacteris sense ser degradats. El ràpid creixement dels bacteris sumat al fet que la introducció del vector els confereix una avantatge selectiva de creixement (com la resistència a un antibiòtic present en el medi de creixement), fa que es produeixin milions de còpies en poc temps. La producció d'aquests plasmidis comporta la generació de bacteris competents (capaços d'incorporar DNA) mitjançant tractaments químics, la transformació dels mateixos (procés d'incorporació del DNA per xoc tèrmic o electroporació), selecció i creixement/amplificació d'una colònia de bacteris transformats (que prové d'un sol bacteri, i per tant, tindrà un sol tipus de plasmidi) i purificació del plasmidi dels bacteris.

En el nostre laboratori, tant la preparació bacteris competents (soques d' *E.coli* DH-5 α Dam-/Dmc- i XL1-Blue), com els medis de creixement dels bacteris (LB líquid, plaques d' LB-agar amb ampicil·lina, etc) i les purificacions de 0,5-1mg de

DNA plasmídic a partir de 250ml de cultiu bacterià (mitjançant el kit de Qiagen, *Plasmid Maxi Kit*), han estat realitzades per l'equip tècnic del laboratori. Aquestes purificacions de 0,5-1mg de DNA són requerides pels vectors plasmídics emprats per assaigs funcionals en cèl·lules C2C12, ja que se'n necessiten grans quantitats per les transfeccions. Les purificacions a petita escala, a partir de 3-5ml de cultiu bacterià per obtenir 5-15µg totals de DNA plasmídic, van ser realitzades amb el kit de Qiagen *Plasmid mini kit*. Aquestes purificacions a petita escala s'utilitzen per comprovar la correcta lligació o obtenció de plasmidis, ja sigui mitjançant enzims de restricció o seqüenciació, ja que aquests assaigs requereixen només 150-900ng de DNA. Respecte a la transformació, en aquesta tesi s'ha emprat la transformació per xoc tèrmic, el protocol de la qual es pot trobar en manuals de biologia molecular generals com *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 1989) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 2001).

7.2.2 Restricció i lligació de DNA

El descobriment i la disponibilitat comercial d'enzims de restricció i de lligació ens permet poder tallar i unir (procés conegut com lligar) específicament molècules de DNA (només per una determinada seqüència que reconegui l'enzim que generi els extrems compatibles a unir). Per tant, podem sintetitzar noves molècules de DNA de gran tamany al laboratori sense recórrer a la síntesi química. Per portar a terme aquestes reaccions, hem emprat els diferents enzims de restricció i la T4 lligasa de la casa comercial *New England Biolabs*. Els protocols a seguir i els detalls més específics per aquestes reaccions es poden trobar a les especificacions dels productes adquirits o en manuals de biologia molecular generals com *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 1989) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 2001).

7.2.3 PCR

La reacció en cadena de la polimerasa permet amplificar específicament molècules d'DNA per acció de l'enzim DNA polimerasa i gràcies als encebadors, dues molècules d'DNA que delimiten la regió a amplificar. Aquesta tècnica també permet afegir al producte d'amplificació extrems compatibles amb dianes d'enzims de restricció, fet que possibilita la seva clonació entre les dianes específiques dels vectors. El primer pas abans de realitzar una PCR és dissenyar els encebadors o '*primers*' que permetran l'amplificació específica d'un producte. En la present tesi doctoral el disseny s'ha realitzat utilitzant el programa *Primer Select* (Lasergene), seguint els següents criteris:

- 1) La longitud de l'encebador ha de tenir entre 15 i 30 parells de bases.
- 2) Els encebadors no han de formar dímers entre ells ni estructures secundàries o *hairpins*. Normalment es consideren bons els encebadors en què la formació d'aquesta estructura té una energia lliure de Gibbs igual o major a -3,1.
- 3) Han de tenir una temperatura de dissociació (*melting*) entre 52-55°C i permetre la hibridació a 55-60°C. Com més alta sigui la temperatura d'hibridació més específica serà la unió, però la PCR pot resultar menys eficient.
- 4) No han de contenir repeticions de nucleòtids, per evitar que la DNA polimerasa sintetitzi de manera errònia el producte a amplificar.
- 5) El contingut de C/G ha d'estar al voltant del 40-60% i preferiblement, els extrems 3' dels encebadors han de contenir una C o una G. Això és degut a què entre C i G es formen 3 ponts d'hidrogen, generant una interacció més estable.

Generalment la PCR consisteix en una sèrie de 20 a 40 cicles, en cadascun dels quals hi podem distingir tres etapes: la desnaturalització del DNA a 95°C, la hibridació dels encebadors amb el DNA motlle i l'elongació de la cadena. La temperatura d'hibridació depèn de les característiques dels encebadors

emprats; sol estar entre 50 i 60°C, mentre que la temperatura i el temps d'elongació depenen de la polimerasa utilitzada i de la longitud del fragment que es vol amplificar. Habitualment el pas d'elongació es realitza a una temperatura propera als 72°C i el temps aproximat és de 30 a 60 segons. Els cicles solen anar precedits per un únic pas inicial per desnaturalitzar el DNA. Aquest pas o *Hot start* es realitza a 95°C durant uns 5 minuts. Un cop finalitzats tots els cicles de la PCR, hi ha un pas d'elongació final, a 72°C durant 5-10 minuts, per assegurar que totes les molècules d'DNA s'han sintetitzat completament. La PCR es duu a terme en un termociclador, en un volum final de reacció de 50µl. Els components necessaris per realitzar la PCR són el DNA motlle, el parell d'encebadors, la DNA polimerasa, els dNTPs (barreja que conté dATP, dTTP, dCTP i dGTP) i el tampó òptim per l'activitat i estabilitat de la polimerasa. Segons la finalitat de la PCR s'utilitzen diferents tipus de polimerases, com la Taq, més processiva o la Pfu, de més alta fidelitat. En cada reacció de PCR es solen posar entre 100 i 200ng de DNA motlle mentre que la concentració d'encebadors és variable (100-500nM aproximadament). Les condicions de la PCR s'han d'optimitzar sempre per cada parell d'oligonucleòtids.

7.2.4 Clonació de miRNA

Els microRNA (miRNA) són seqüències de RNA de 21-23 nucleòtids que, com els siRNA, són capaces de bloquejar la traducció i activar la degradació dels mRNA on s'hibriden. Aquest miRNA no es genera directament com a tal, sinó que en un inici es transcriu com a pri-miRNA (*primary miRNA*). A diferència dels siRNA que estan controlats per promotors de tipus *Pol III* (per transcrits curts), els gens que codifiquen per aquests pri-miRNA estan controlats, a nivell endogen, per promotors de tipus *Pol II* (o Polimerasa II), que són més potents i poden ser teixit específics entre d'altres propietats. Aquest pri-miRNA consta d'un *hairpin*

de 70 nucleòtids (tot i que no és un *hairpin* totalment complementari com els del shRNA i és on es troben els 21-23 nucleòtids del miRNA) i dues seqüències d'una sola cadena a 5' i 3' (una seqüència *cap* i una cua poliA respectivament). Aquest pri-miRNA es forma i es processa al nucli per la ribonucleasa *Drosha*, donant lloc al pre-miRNA, que consta només del *hairpin* de 70 nucleòtids, el qual és exportat al citoplasma. Un cop exportat, el pre-miRNA es processat per la Dicer (la mateixa ribonucleasa que processa els shRNA) per formar els miRNA definitius de 21-23 nucleòtids.

Amb això, s'ha emprat el sistema *Block-It Pol II* de Life technologies, el qual consta del vector d'expressió en mamífers pcDNA 6.2 Gw/EmGFP/miR que codifica per un pri-miRNA sota el control d'un promotor CMV. Aquest pri-miRNA conté un *cap* i el cDNA de la EmGFP a 5' i després conté una cua poliA de la timidina kinasa a 3'. En la regió on hauria de ser el *hairpin* del pri-miRNA, hi ha una diana Bsal per on es poden hibridar i lligar qualsevol miRNA de 21-23 nucleòtids dissenyats contra el gen d'interès. A més, hi ha una diana que genera extrems cohesius de BamHI i BglII que permet afegir més d'una seqüència de miRNA en tàndem. Per últim, aquest vector conté el pri-miRNA flanquejat per seqüències *attB*, permetent la generació d'un *entry clone* i els corresponents vectors d'expressió adenovirals del pri-miRNA. Per dissenyar i clonar els miRNA, es va seguir el següent protocol:

- 1) S'entra a la pàgina web <http://rnaidesigner.Life technologies.com/rnaiexpress> que conté el *software on-line* necessari per dissenyar seqüències de miRNA específiques contra un determinat gen. Un cop s'entra la pàgina web, es selecciona l'opció de disseny de miRNA i s'introdueix, en el software de disseny, el nombre d'accés de la seqüència de cDNA del gen contra el qual es volen dissenyar els miRNA (per Opa1 de ratolí, el número va

ser el NM_133752 i per Mfn1 de ratolí, el NM_024200). Un cop el *software* genera les seqüències de miRNA òptimes contra el gen del nombre d'accés introduït, aquestes ja es poden adquirir directament per la mateixa web. Les seqüències generades pel programa, a més a més del miRNA òptim, ja contenen els extrems oligonucleotídics compatibles amb els extrems generats per la digestió amb BsaI del pCDNA 6.2 Gw/EmGFP-miR, que és el vector on es clonen els miRNA (veure Figura 117). Per tant, un cop disponibles els oligonucleòtids i el vector digerit amb BsaI, es procedeix a la hibridació dels oligonucleòtids i la posterior lligació al vector.

2) Per realitzar la hibridació, es dilueixen els oligonucleòtids a una concentració final d'ambdós a 50µM en aigua milliQ i en un tub eppendorf. Seguidament, s'afegeix aquest tub en un vas de precipitats amb aigua bullint i es deixa refredar en aquest mateix vas fins a temperatura ambient. Aquesta desnaturalització inicial i la renaturalització gradual permet la formació eficient de dímers entre els oligonucleòtids *top* i *bottom*.

3) Un cop hibridats, es lliga el pCDNA 6.2 obert amb BsaI amb els miRNA hibridats (11,5ng de vector i 0,5µl d'oligos anellats 50µM en un total de 20µl de reacció de lligació). El vector pCDNA 6.2 confereix resistència a la espectinomicina. Es transformen bacteris DH-5α per xoc tèrmic amb 10µl de la lligació i se sembren en plaques LB-agar amb 50ng/µl d'espectinomicina (Sigma).

4) Es comprova la lligació amb els plasmidis purificats de l'amplificació de les colònies resistents a espectinomicina per seqüenciació o per digestió Sall-XhoI i la visualització dels fragments amb el tamany corresponent en un gel d'agarosa de l'1% (insert dels miRNA es correspon a una banda de 150 bp).

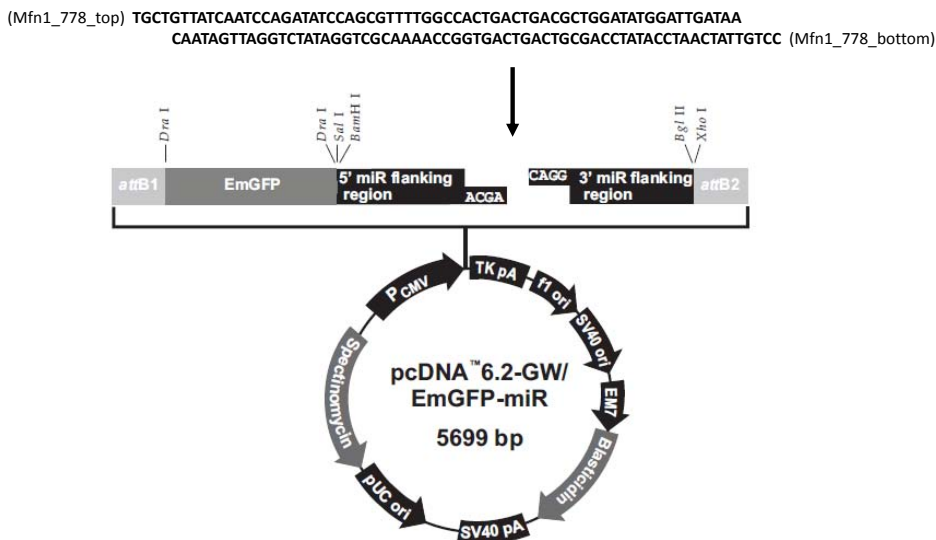


Figura 117. Esquema dels passos 1-3 de la clonació d'un miRNA en pcDNA 6.2. Es mostra un exemple de la hibridació dels oligonucleòtids que contenen un miRNA (en aquest cas, el de la posició 778 respecte l'inici de l'mRNA de Mfn1) i el posterior clonatge en el pcDNA 6.2.

El vector pcDNA 6.2-Gw/EmGFP-miR, a més, té l'opció de poder clonar diferents miRNA en tàndem en el mateix pri-miRNA (veure Figura 118). A 5' de l'*attB2* i de la senyal poli A i a 3' de la regió del miRNA hi ha una dia *BglIII* i una de *XhoI*. A 3' de *attB1* i del cDNA de la EmGFP i a 5' de la regió del miRNA hi ha una diana *BamHI* i una *Sall*. Les dianes *BglIII* i *BamHI*, en ser digerides, generen extrems cohesius que poden hibridar, i, per tant, lligar-se. De totes maneres, quan els extrems cohesius es lliguen, no generen cap diana *BglIII* ni *BamHI*. Això per tant, permet la clonació en tàndem dels diferents miRNA. Es van generar deu construccions: dues amb 2 miRNA diferents contra Opa1 (amb la EmGFP), dues amb 2 miRNA diferents contra Opa1 (sense la EmGFP), dues amb 2 miRNA diferents contra Mfn1 (amb la EmGFP), dues amb 2 miRNA diferents contra Opa1 (sense la EmGFP), una amb 2 miRNA control (miRNA control proveït per Life technologies) amb la EmGFP i una amb 2 miRNA control sense la GFP. El protocol és el següent:

- 1) Es digereix el vector amb un miRNA ja clonat (per exemple pcDNA 6.2 - miRNA1) amb una digestió doble BamHI-XhoI. Aquesta digestió resulta en un miRNA flanquejat per BamHI i XhoI. Es corre en un gel d'agarosa del 2%, es talla i es purifica la banda de l'insert (150 bp).
- 2) Es digereix el segon vector amb un segon miRNA (per exemple, pCDNA 6.2 - miRNA2) amb una digestió doble amb BglII-XhoI. Aquesta digestió linealitzava el vector a 3' del miRNA que conté. Es corre en un gel d'agarosa a l'1%, es talla i es purifica la banda del vector amb el miRNA2 (5759 bp).
- 3) L'insert de 150 bp (miRNA1) amb dianes BamHI i XhoI i el pcDNA6.2-miRNA2 obert per BglII-XhoI (uns 5759 bp) es lliguen en una proporció insert:vector 4:1. Amb això a 5' tindrem el miRNA2 i a 3', per BglII, s'hibridarà l'extrem de BamHI a 5' del miRNA1, quedant doncs a 3' del miRNA2.
- 4) Es comproven les construccions per seqüenciació i per digestió amb Sall i XhoI. Les seqüències dels miRNA es troben en l'apartat 9.1 de l'annex.

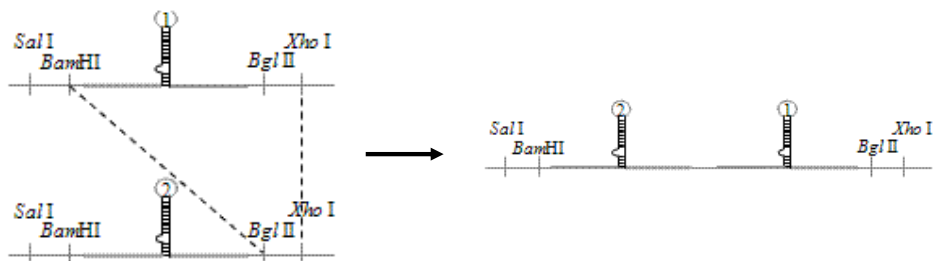


Figura 118. Esquema dels passos 1-3 de la clonació en tàndem dels miRNA. La digestió doble BamHI-XhoI allibera un insert de 150bp que conté el hairpin del miRNA1. La digestió BglII-XhoI obre el vector que ja contenia el miRNA2. BamHI i BglII generen extrems cohesius, però desapareix la diana 5' i XhoI a 3' es manté, permetent una posterior clonació en tàndem.

7.2.5 Clonació per recombinació (*Gateway*)

El sistema *Gateway* es basa principalment en l'activitat de recombinació de dues solucions comercials (anomenades BP II *clonase* i LR II *clonase*, ambdues de Life technologies) que tenen la capacitat de recombinar dues seqüències de DNA específiques (Figura 10 i 11). Aquesta propietat permet substituir fragments de DNA flanquejats per aquestes seqüències específiques. La primera reacció del sistema és l'anomenada BP i té aquest nom perquè la recombinació té lloc entre les seqüències anomenades *attB* (que són les que flanquegen els productes de PCR generats, per exemple) i *attP* (que són les que contenen els vectors proveïts per Life technologies i que flanquegen el DNA codificant per la proteïna antibiòtica *ccdb*; en aquesta tesi hem emprat només el vector pDONR 221). Totes dues seqüències tenen una composició nucleotídica diferent i específica. Aquesta primera reacció BP fa que obtinguem el plasmidi denominat com a *entry clone*, que es defineix com el plasmidi amb el nostre insert flanquejat per seqüències *attL* dins un vector, com ara el pDONR 221. La formació de les seqüències *attL* són el resultat de la recombinació específica entre les seqüències *attB* i *attP*. S'anomena *entry clone* perquè hi ha tota una sèrie de *destination vectors* (com vectors adenovirals, lentivirals, d'expressió en mamífers, etc, alguns d'ells proveïts per Life technologies) que contenen seqüències *attR* flanquejant també el DNA codificant pel *ccdb* (el mateix antibiòtic que codificava el pDONR). Per tant, mitjançant la segona reacció de recombinació LR, podem transferir l'insert de l'*entry clone* flanquejat pels *attL* a qualsevol dels *destination vectors* que contenen els *attR*. Amb això, l'*entry clone* és el plasmidi d'entrada a tots els plasmidis de destinació (*destination vectors*). El protocol següent va ser el següent:

Reacció BP

- 1) S'afegeixen 150ng de pcDNA 6.2.
- 2) S'afegeixen 150ng de pDONR 221.
- 3) Es dilueixen fins a 8 μ l d'aigua milliQ totals.
- 4) S'agita breument la solució de la BP, que es manté en un *Stratacooler* (a -20°C), i se n'afegeixen 2 μ l.
- 5) Es deixa entre 1 i 2 hores a 25°C.
- 6) Es tracten els 10 μ l de la BP amb 1 μ l de Proteïna K a 2 μ g/ μ l, durant 10 minuts a 37°C.
- 7) Es transformen per xoc tèrmic entre 1-2 μ l d'aquesta reacció en XL1-Blue competents, en una placa d'LB-agar amb Kanamicina. La resta de la reacció es pot guardar a -20°C.

Reacció LR

- 1) S'afegeixen 150 ng de plasmidi de *l'entry clone*.
- 2) S'afegeixen 150 ng de *destination vector*.
- 3) Es dilueixen fins a 8 μ l d'aigua milliQ totals.
- 4) S'agita breument la solució de la LR, que es manté en un *Stratacooler* (a -20°C), i se n'afegeixen 2 μ l.
- 5) Es deixa entre 2-16 hores a 25°C (com més temps, més còpies de vector d'expressió es generen).
- 6) Es tracten els 10 μ l de la LR amb 1 μ l de Proteïna K a 2 μ g/ μ l, durant 10 minuts a 37°C.
- 7) Es transformen per xoc tèrmic entre 3-5 μ l d'aquesta LR en XL1-Blue competents, amb ampicil·lina en la placa d'LB-agar. La resta de la reacció es pot guardar a -20°C.

Els vectors adenovirals (Figura 119) generats van ser comprovats per seqüenciació, segons el protocol trobat en les especificacions del *Big Dye 3.1* (Applied Biosystems), amb l'única modificació de reduir a 2µl el volum afegit de la *master mix* del *Big Dye* en la reacció d'amplificació de 10µl totals. Les amplificacions o seqüenciacions van ser analitzades a la Unitat de Genòmica dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. Els encebadors emprats per seqüenciar aquest vectors (sempre s'afegien 0,33µl d'una solució dels mateixos a 10µM) es troben en l'apartat 9.2.3 de l'annex. Simultàniament, també es van realitzar anàlisis de comprovació mitjançant digestió per enzims de restricció, per a comprovar que el tamany dels vectors era l'adient, ja que recombinacions no desitjades o inespecífiques podrien del·leccionar parts dels mateixos.

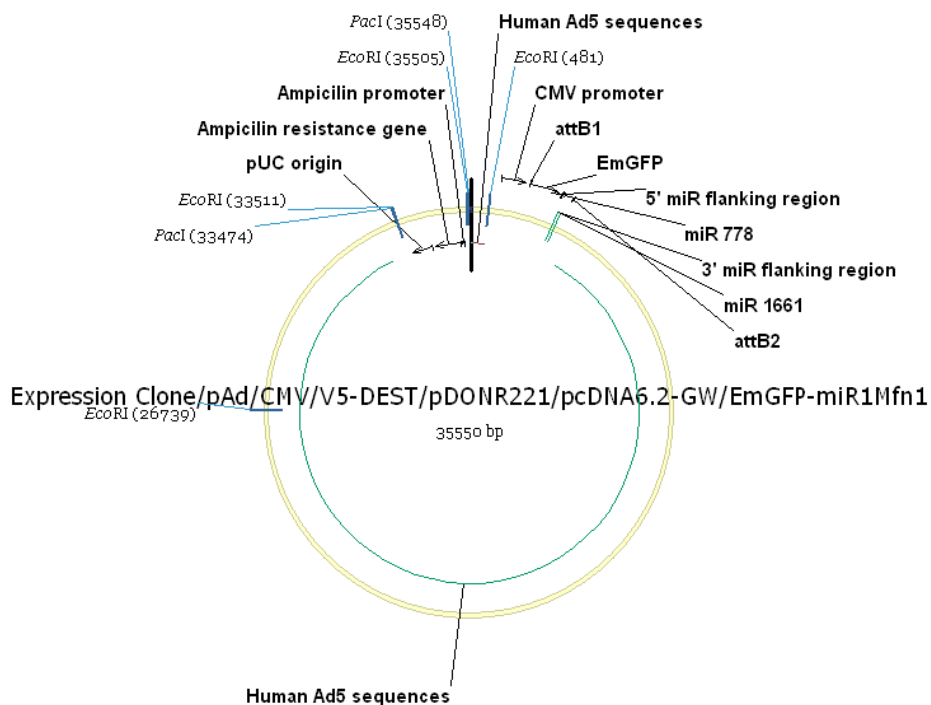


Figura 119. Mapa del plasmidi adenoviral final per produir el miR1 de Mfn1. Aquest mapa és exactament el mateix pels adenovirus miR2 Mfn1, miR1 Opa1, miR2 Opa1 i miRctrl, amb la diferència de la seqüència dels dos miRNA. Es mostren les dianes PacI necessàries per linealitzar

el vector i la digestió EcoRI que s'utilitza per comprovar el vector (desapareix una banda de 2548 bp ja que s'elimina una diana del vector buit).

Un cop comprovats els vectors adenovirals per seqüenciació (encebadors CMV i V5) i restricció amb EcoRI, per transfectar vectors adenovírics funcionals, cal digerir els obtinguts amb l'enzim de restricció PacI (New England Biolabs). Per tant, és molt important comprovar primer que el nostre insert no té cap diana per PacI. Cap dels inserts clonats en aquesta tesi tenia dianes PacI. Aquesta digestió permet linealitzar el genoma adenoviral, la qual és molt important per la seva encapsidació i formació de partícules víriques. Aquesta digestió només elimina la part del vector requerida per ser amplificat en bacteris (resistència a ampicil·lina entre altres). El protocol de digestió va ser el següent:

-20µg de pAdeno-CMV-V5 amb l'insert desitjat

-6µl de Tampó 10x de PacI

-3µl PacI

-fins a 60 µl amb aigua milliQ

Es deixa o/n a 37°C

Posteriorment, es va córrer un gel d'agarosa a l'1% amb 500ng de la digestió per comprovar-ne la seva eficiència (mitjançant la presència de la banda de 2000 bp correspon a la part del vector que no és genoma adenoviral). Un cop confirmada, tot el volum de la digestió va ser portat fins a 100µl amb aigua milliQ i purificat pel mètode del fenol/cloroform (el protocol es pot trobar a *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 1989) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 2001)). Es va elegir aquest mètode enlloc de l'emprat en aquesta tesi per diferents motius. El primer va ser que l'insert residual no interfereix en l'experiment posterior de transfecció, per tant no cal tallar la banda del vector adenoviral del gel per separar-ho de l'altre

fragment. El segon motiu és que, per aquest mètode, la recuperació d'DNA era major, degut a què el vector digerit tenia aproximadament 30kb (les columnes el podrien trencar o eluir-lo més ineficientment). El tercer i últim motiu és que la qualitat del DNA obtingut era major (mesurada com a relació d'absorbància a 260/280nm), propietat indispensable per poder ser transfectat eficientment. Un cop precipitat el DNA de la digestió, es resuspensia en 10µl d'aigua milliQ. Aquesta solució era la que es va transfectar en HEK293A (1µg) per generar els adenovirus.

7.2.6 Purificació de fragments de DNA

A part dels protocols de purificació de DNA plasmídic, hi ha protocols específics per purificar fragments de DNA lineals; com ara per exemple els productes de PCR o fragments de digestions. Aquesta purificació és absolutament necessària, ja que la presència dels tampons i dels diferents enzims emprats per la PCR o les digestions interfereixen en les reaccions de lligació. El primer pas d'aquesta purificació és la realització d'un gel d'agarosa amb bromur d'etidi per comprovar que la PCR ha funcionat i per separar els fragments de DNA desitjats de la resta en les digestions (els protocols de realització del gels d'agarosa es poden trobar a *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 1989) i *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 2001)). El segon és l'extracció i purificació del DNA del gel d'agarosa, emprant el kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE healthcare). Per aquest últim pas, es van seguir exactament les especificacions del producte. Aquest protocol permetia l'obtenció d'una solució del DNA lineal en aigua milliQ. El bromur d'etidi és un agent cancerigen. Per tant, qualsevol líquid o sòlid que hagi estat en contacte amb aquest, s'ha de dipositar en el corresponent recipient residus químics tòxics o perillousos.

7.2.7 Purificació de RNA total

A l'hora de treballar amb RNA cal ser molt més cuidadosos que treballant amb DNA o proteïnes, degut a la presència abundant d'RNAses (enzim que hidrolitzen l'RNA) a l'ambient, sobretot en la pell i en la pols ambiental. És per aquest motiu que s'ha de treballar sempre amb guants i amb material lliure de RNAses. De manera important, el primer pas d'homogenització de qualsevol mètode per a obtenir RNA, ha de ser realitzat en presència d'inhibidors d'RNAases. D'aquesta manera es bloqueja l'acció de les presents intracel·lularment o en la mostra. En aquesta tesi s'ha utilitzat el RNAeasy mini kit (Qiagen), el qual es basa en una purificació de l'RNA total per unió i elució específica a columnes de silici. Amb aquest mètode s'obté un RNA de molta qualitat (manifestada per la relació d'absorbàncies a 260 i 280nm i l'absència de restes d'etanol o isopropanol, com ho demostren els valors baixos d'absorbància a 220nm). A més a més, aquest protocol conté un pas de tractament amb DNasa I que elimina qualsevol resta de DNA genòmic. Finalment, es va mesurar la concentració al *nanodrop*.

7.2.8 Síntesi de cDNA

En cop s'ha purificat i s'ha comprovat que l'RNA no s'ha degradat per acció de les RNAses, es pot procedir a la síntesi de cDNA. Es va realitzar emprant l'oligo dT (Life technologies) com a encebador i un enzim amb activitat transcriptasa reversa. L'oligo dT s'uneix a la cua de poli A dels diferents mRNA i l'enzim sintetitza el cDNA, a partir de l'oligo dT, emprant com a motlle el mRNA. Es va utilitzar el kit de Life technologies *SuperScript II Rnase H-Reverse Transcriptase*, amb l'inhibidor de RNAses RNaseOUT (Life technologies), i es va realitzar la retrotranscripció de 2µg de RNA total seguint les indicacions del kit. Degut a que la reacció de síntesis té lloc en 20µl totals de reacció i que es considera un 100% d'eficiència en la retrotranscripció, la concentració de cDNA obtinguda

són 100ng/ μ l de cDNA equivalents. Per comprovar que la síntesi ha estat correcte, es va emprar part de la solució de la mateixa com a motlle d'una PCR i es va comprovar la presència d'amplificació mitjançant un gel d'agarosa. Si la síntesi ha anat bé, s'amplificarà el cDNA i es visualitzarà la banda corresponent al gel d'agarosa. Normalment s'utilitzen les mateixes condicions de PCR que les emprades en la *Real-Time PCR*. La única diferència és que s'utilitza la Taq Polimerasa (DNA polimerasa) de Biotools (molt processiva i molt més econòmica) enlloc dels reactius emprats per *Real-Time PCR* (molt cars).

7.2.9 *Real-Time PCR*

Un cop obtingut el cDNA, es poden estimar els nivells de mRNA mitjançant la quantificació del cDNA sintetitzat mitjançant una PCR a temps real (*Real-Time PCR*). Com és conegut, el substrat o el nombre de molècules de DNA inicials determina la quantitat de còpies sintetitzades durant la PCR. Per tant, a més còpies de cDNA inicial, més còpies de DNA s'aniran generant durant la PCR. De totes maneres, arriba un moment en què s'han generat tants milions de còpies que el sistema de detecció es satura i s'observa que no hi ha diferències en la quantitat de DNA amplificat entre mostres amb diferents quantitats de substrat o DNA motlle inicial (*plateau* o fase de saturació). Empíricament, això acostuma a passar en tots els casos a cicle 35-40 de la PCR a partir de diferents cDNAs i d'amplificacions de diferents gens. Amb això, només si es segueix a temps real (*Real-time*) la reacció d'amplificació (PCR), en un determinat rang de cicles, és possible distingir quines mostres partien d'un major nombre inicial de molècules de cDNA, ja que en aquell moment és quan es poden detectar diferències en la quantitat total de DNA. Per tant, per un valor de quantitat de DNA detectat en un determinat moment de la PCR, les mostres amb un major nombre inicial de molècules de cDNA motlle necessitaran menys cicles de PCR per arribar a aquell determinat valor de quantitat de DNA detectat. O el que és

el contrari aquella mostra que tingui menys quantitat de molècules de cDNA motlle, necessitarà un nombre major de cicles per aconseguir obtenir la mateixa quantitat de molècules de DNA. Així doncs, els paràmetres detectats per aquesta tècnica són el nombre de cicles (Ct) i la quantitat de DNA amplificat. Perquè sigui correcte la comparació dels valors de Ct entre les diferents mostres, és molt important obtenir aquest valor en el moment en què la relació entre les Ct i la quantitat d'DNA amplificat és lineal en totes les mostres a comparar. Per tant, el valor de Ct sempre es calcula per una determinada quantitat fixa de DNA. La detecció del DNA amplificat es fa mitjançant dues metodologies diferents segons els compostos emprats:

-Sybr Green: aquest compost s'uneix específicament al DNA de doble cadena i és capaç d'emetre fluorescència quan s'hi uneix. Ja que el cDNA i els encebadors són molècules de cadena simple, aquest només s'unirà als productes d'amplificació. És per aquest motiu que els encebadors dissenyats per aquest mètode no han de formar dímers. Es va emprar el *Sybr Green* d'Applied Biosystems, el qual és venut en una *master mix* que ja conté la DNA polimerasa i els dNTPs necessaris per l'amplificació (*SYBR Green PCR Master Mix*). Els encebadors, en canvi, s'han d'afegir i acostumen a ser dissenyats i testats pels investigadors.

-Taqman: en aquest mètode, la fluorescència també es detecta mentre es va sintetitzant la molècula de DNA. El fonament però és diferent. Hi ha una sonda (oligonucleòtid) que s'hibrida al cDNA en la regió d'amplificació (la regió que cau entre els dos encebadors). Aquesta sonda té la particularitat que conté un *quencher* (TAMRA) i un fluoròfor (FAM) alhora, a cada extrem de la mateixa. El *quencher* absorbeix la fluorescència emesa pel fluoròfor i, per tant, quan està sencera i hibridada al DNA no hi ha detecció de la mateixa. Però quan comença

l'amplificació, l'activitat 5' 3' exonucleasa de la DNA polimerasa trenca aquesta sonda unida, la qual cosa allunya el *quencher* del fluoròfor i la fluorescència és emesa i detectada. És un mètode, per tant, més específic, en el qual la generació de dímers per part dels encebadors no afecta a la quantificació. La barreja amb els encebadors i la sonda es poden adquirir, per cada gen, a Applied Biosystems (*TaqMan gene expression assays*). A part de la solució amb la sonda, també es va emprar una *master mix*, com en el cas del Sybr Green, completant els reactius necessaris per aquesta PCR (*TaqMan Universal PCR Master Mix*, Applied Biosystems).

El termociclador que realitza la *Real-Time PCR* i que té la capacitat d'estimular i detectar la fluorescència a temps real està localitzat a la Unitat de Genòmica dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona; model Abi-Prism 7900 HT d'Applied Biosystems.

Procediments i mètodes de càlcul pels encebadors Sybr Green

El primer pas és el disseny d'encebadors per amplificar el gen d'interès. Les normes són les mateixes que per uns encebadors normals de PCR (sobretot és essencial que no formin dímers entre ells, ni *hairpins*, ja que seran quantificats, però hi ha quatre normes addicionals:

1) Utilitzar el programa *on-line* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nih.gov/blast>) que permet determinar si els encebadors es poden unir a altres gens o cDNAs no desitjats presents en les bases de dades. Això és molt important per la *Real-Time PCR*, ja que si volem quantificar el cDNA d'un sol gen, uns encebadors que siguin capaços d'unir-se a, i per tant, amplificar i quantificar alhora altres gens de la mateixa espècie, no ens serveixen.

2) El producte d'amplificació ha de tenir entre 80 i 150 parells de bases. El fet que el producte tingui aquest baix nombre de parells de bases permet augmentar l'eficiència d'amplificació a cada cicle de PCR, millorant per tant la precisió de la quantificació. Alhora, s'ha de trobar la concentració òptima d'encebadors per realitzar l'amplificació, sense que formin dímers (normalment es troba entre 150 i 300 nM), els quals es poden visualitzar amb un gel d'agarosa al 2,5%).

3) Dissenyar encebadors que hibridin en diferents exons del gen a mesurar. Tot i que els mètodes de purificació de RNA eviten contaminacions de DNA genòmic que no ho fan obligatori, aquest disseny assegura que els encebadors seran incapaços d'amplificar DNA genòmic contaminant en la mostra, que interfereix en la quantificació.

4) L'amplificació que duu a terme una parella d'encebadors ha de presentar un pendent de $-3,321$ en la relació lineal entre el logaritme dels ng equivalents de cDNA posats a amplificar (eix X) i el nombre de cicles (eix Y). Aquest valor de pendent s'obté de la quantificació, per *Real-Time PCR*, de diferents solucions de les quals se sap els nanograms de cDNA equivalents per microlitre (dilucions seriades d'una mateixa mostra). Aquest valor de $-3,321$ significa que a cada cicle s'han amplificat el 100% de còpies del DNA corresponent als encebadors. Per tant, com més pròxim a $-3,321$, més eficients i bons són els primers. Pendents amb valors de fins a $-3,45$ són acceptables. Pendents amb valors més petits de $-3,31$ poden atribuir-se a la presència de dímers d'encebadors o de contaminants en la PCR, ja que significa que s'amplifiquen més còpies de DNA per cicle de les que hi ha inicialment. El rang de dilucions seriades de cDNA equivalents emprat és el següent: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 ng/ μ l. Normalment, la mostra que s'utilitza per realitzar el banc de dilucions és aquella de la qual s'espera un major nivell d'expressió del gen a mesurar. La llista de tots els encebadors emprats es troben a l'apartat 9.2.1 de l'annex. A més, aquest càlcul

de la pendent es realitza per cada gen a mesurar (a part de per testar si els encebadors són eficients) per calcular els seus nivells relatius en una mostra. Amb això, com la mesura de la *Real-Time PCR* ens dóna el nombre de cicles per cada mostra de cDNA, es poden obtenir els nanograms de cDNA equivalents als que es corresponen aquest valor de cicle (Ct), substituint el valor de Ct en l'equació de la recta amb pendent $-3,321$. Aquí hi torna a haver una segona equivalència (la primera era pels $2\mu\text{g}$ d'RNA retrotranscrits), que és que la quantitat de cDNA d'un gen concret en una mostra té una relació proporcional o equivalent amb la quantitat total de cDNA retrotranscrit. Per tant, els nanograms de cDNA obtinguts per un gen amb aquest mètode no són reals, són equivalents.

Finalment, es va utilitzar el mateix mètode de càlcul per determinar els nivells de gens anomenats *housekeeping*, que són gens d'expressió molt abundant i constant en les diferents mostres a mesurar. Acostumen a ser gens estructurals que, en aquesta tesi, s'ha utilitzat la ARP (*acidic ribosomic protein*). És essencial la determinació d'aquests gens perquè permet corregir diferències de nivells d'expressió o de cDNA degudes a causes metodològiques, com ara per exemple, eficiències de retrotranscripció diferents degudes a què la qualitat de les solucions de RNA eren diferents, etc. Els ng de cDNA equivalents per cada gen es divideixen per valors obtinguts d'aquests *gens housekeeping*. Això significa que els valors d'expressió obtinguts per un gen són sempre relatius al *housekeeping*. La reacció de PCR es pot realitzar per duplicat o per triplicat per cada mostra en plaques de 384 pous. El volum total emprat pot estar entre 16 i $10\mu\text{l}$. Una reacció d'exemple amb els encebadors a 150nM és la següent:

- $0,8\mu\text{l}$ cDNA diluït $1/10$ (8 ng de cDNA equivalents)

- $0,24\mu\text{l}$ Encebador $5'$ a $10\mu\text{M}$.

- 0,24µl Encebador 3' a 10µM.
- 8µl *SYBR Green master mix 2X*
- fins a 16µl amb aigua milliQ

En el termociclador AbiPrism 7900HT cal elegir que mesurarem una placa mitjançant el fluoròfor Sybr Green, ja que pot detectar altres fluorescències (FAM per exemple). Després dels 40 cicles, el termociclador afegeix una etapa de *melting* o dissociació. Aquesta etapa el que realitza és dissociar el producte de DNA obtingut mitjançant l'augment gradual de temperatura (que es detectarà com pèrdua de fluorescència màxima a una determinada temperatura, representat com una corba). La temperatura de *melting* o dissociació és específica per cada molècula de DNA (depèn de la seva composició nucleotídica). Això significa que si hi ha un sol producte d'amplificació, hi haurà una sola corba de *melting*. Per tant, és una manera de verificar que només s'ha amplificat un sol cDNA. Alternativament, també es podria realitzar mitjançant l'anàlisi de les mostres de PCR en un gel d'agarosa i la visualització d'una sola banda.

Procediments i mètodes de càlcul pels encebadors TaqMan

Es pot adquirir, a la casa comercial Applied Biosystems, una barreja amb els encebadors i la sonda per qualsevol dels gens identificats en les bases de dades. Amb la qual cosa, no és necessari el disseny dels mateixos ni testar-los. L'eficiència d'aquests encebadors sempre estan al voltant del 100%. Amb això, el càlcul dels valors d'expressió es realitza amb el mètode de ΔCt . Com en el cas del mètode de càlcul emprat pel Sybr Green, els valors d'expressió d'un gen són relatius als valors d'expressió d'un altre *gen housekeeping*. Per tant, en el cas que tots els encebadors (gen interès i *housekeeping*) amplifiquin amb una

eficiència del 100%, es pot aplicar la següent fórmula (Ct: cicles totals; N= ng cDNA equivalents relatiu al housekeeping):

$$N = 2^{Ct_{gen}} / 2^{Ct_{housekeeping}} = 2^{Ct_{gen} - Ct_{housekeeping}} = 2^{\Delta Ct}$$

És per aquest motiu que l'eficiència dels encebadors del *housekeeping* i del gen a mesurar ha de ser la mateixa i del 100%, perquè sinó no és cert que a cada cicle es duplica el contingut d'DNA. Per tant, es poden emprar els valors de mesures realitzades per Sybr Green i TaqMan sempre que les eficiències siguin les mateixes. L'avantatge d'aquest mètode és que no cal fer recta patró, estalviant per tant molt reactiu, temps i diners. La barreja d'encebadors i sonda té un elevat preu. Per això, es va decidir reduir encara més el volum total de reacció (fins a 10 µl). Per tant, un exemple de reacció TaqMan és el següent:

-0,8µl cDNA diluït 1/10 (8 ng de cDNA equivalents)

-0.5µl *TaqMan probe* 20x

-5µl *TaqMan® Universal PCR Master Mix* 2x

-fins a 10µl amb aigua milliQ

Degut al fonament del mètode de detecció, aquí no es pot determinar la presència d'un sol producte de PCR mitjançant la corba de dissociació o *melting*, ja que no hi ha res fluorescent que s'uneixi específicament al DNA de doble cadena. Aquí, per tant, s'ha de comprovar la presència d'un sol producte d'amplificació realitzant un gel d'agarosa al 2,5%. La llista de tots els encebadors emprats es troben a l'apartat 9.2.2 de l'annex.

Com a qualsevol experiment, la *Real-Time PCR* ha de contenir controls negatius. El primer i obvi, com a qualsevol reacció de PCR, és fer una reacció amb tots els components necessaris però afegint aigua milliQ enlloc de la solució de cDNA. Aquest control negatiu serveix per comprovar que cap dels reactius ni materials

emprats estan contaminats amb cDNA. El segon control, i que és molt important en els casos de mesura per Sybr Green amb encebadors no dissenyats a diferents exons, és afegir la dilució corresponent de l'RNA enlloc de la dilució de cDNA (o sigui, un control negatiu de retrotranscripció, amb tots els reactius menys la retrotranscriptasa i diluït també 1/10). Aquest és un control de la presència de DNA genòmic a la mostra, ja que si hi ha amplificació, només pot venir d'aquest (sempre que el primer control negatiu de PCR hagi sortit bé). Un control positiu normalment no és necessari perquè ja s'ha comprovat la síntesi dels cDNAs prèviament.

7.2.10 Genotipació del ratolí KO específic de múscul esquelètic per Opa1

La genotipació del model de ratolí KO de Opa1 s'ha realitzat mitjançant PCR a partir de DNA genòmic provinent de les cues dels ratolins. Aquest protocol d'extracció de DNA es basa en la digestió d'un tros de cua de 0,5cm de longitud amb proteïnasa K i la posterior precipitació del DNA amb etanol. Les cues es tallen en el moment del deslletament dels ratolins i es guarden en tubs eppendorf a -20°C. El procediment següent és el següent:

- 1) Es prepara per cada mostra una barreja que contingui 490µl de tampó de lisi i 10µl de proteïnasa K, provinent d'una concentració de 20mg/ml. La composició del tampó de lisi és: Tris-HCl 100 mM pH 8,5; NaCl 200 mM; SDS 0,2% (p/v) i EDTA 5mM.
- 2) S'afegeixen els 500µl de la barreja a cada tub amb la cua corresponent i s'incuben a 56°C en agitació durant 16 hores.
- 3) Es centrifuguen els tubs 15 minuts a 13.200rpm i es traspassa el sobrenedant a nous eppendorfs que contenen 500 µl d'isopropanol.

- 4) S'agiten els tubs per inversió fins que s'observa l'DNA en forma de precipitat blanc.
- 5) Es centrifuguen els tubs 3 minuts a 13.200rpm i es descarta el sobrenedant.
- 6) S'afegeixen 500µl d'etanol 70% al precipitat, s'agiten i es tornen a centrifugar 2 minuts a 13.200rpm.
- 7) S'elimina el màxim de sobrenedant possible amb cura de no emportar-se el precipitat.
- 8) Es deixen evaporar les restes d'etanol a temperatura ambient amb els tubs oberts i es ressuspèn el pellet en 150-200µl d'aigua miliQ o de tampó TE. El DNA ressuspès es guarda a -20°C.

Per detectar la presència d'un dels llocs loxP es van utilitzar els oligonucleòtids HF2 i HR2 (veure apartat 9.2.4 de l'annex). Amb aquest parell d'encebadors, s'amplifica una banda de 180bp en el cas dels ratolins *wild-type* i una banda de 243bp en el cas dels ratolins Opa1 loxP/loxP. En els ratolins heterozigots, es detecten les 2 bandes.

La reacció de PCR per a la genotipació dels ratolins s'ha dut a terme en un volum final de 50µl. La DNA polimerasa utilitzada ha estat la Taq polimerasa (Biotools). Per cada reacció s'han afegit 200ng de DNA, els encebadors corresponents a una concentració de 400nM, els dNTPs a 0,2mM i el tampó de la polimerasa (Biotools). El termociclador emprat ha estat el model 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems). Les condicions de la PCR han estat les següents: un pas inicial de 5 minuts a 95°C; 35 cicles de desnaturalització (1 minut a 95°C), hibridació (30 segons a 55°C) i elongació (1 minut a 72°C); i un pas final d'elongació d'un minut a 72°C. El producte de PCR es visualitza després d'una electroforesi en un gel d'agarosa al 3%.

7.3 Tècniques de manipulació i detecció de proteïnes

7.3.1 Obtenció d'extractes totals

La majoria d'experiments s'han realitzat en plaques de 6 pous, que és suficient per realitzar entre 3 i 5 assaigs *Western Blot*. Tot el procediment es realitza en gel. El protocol que es va seguir és el següent:

- 1) S'aspira el medi i es fa un rentat amb PBS (intentant aspirar el màxim de volum). Es manté la placa en gel o es congela ràpidament al -80°C .
- 2) Amb la placa en fred (gel), s'afegeixen 100-150 μl de tampó d'extracció (Tris HCl 50mM, NaCl 150mM, NaF 50mM, EDTA 1mM, NaPPi 5mM, NaVO_4 1mM i IGEPAL 1%), s'ajusta el pH a 7,4 i s'afegeix una pastilla d'inhibidors de proteases Complete Mini de Roche per cada 10ml de tampó, que es manté tota l'estona en fred i es prepara fresc el dia de l'extracció.
- 3) S'aixequen les cèl·lules amb el tampó mitjançant un *scraper* i es recull la suspensió amb una pipeta de 1000 μl .
- 4) Es diposita la suspensió en el recipient de vidre de 2cm³ (en gel en tot moment, per l'estabilitat dels inhibidors de proteases i la integritat de les proteïnes) que va acoblat perfectament amb l'homogenitzador de tefló ancorat a un motor Heidolph RZR 2051 control. Es puja i es baixa el recipient de vidre unes 15 vegades (mantingut en tot moment en gel) i girant el tefló a unes 1800rpm. Això assegura una lisi cel·lular total. S'agafa l'homogenat amb una *pasteur* de vidre i es diposita en un eppendorf en gel.
- 5) Es realitza una última centrifuga a 900rpm i el sobrenedant que s'obté és el lisat total, que es guarda a -20°C .

7.3.2 Determinació de la concentració de proteïna

Per mesurar la concentració de proteïna s'ha emprat el mètode de l'àcid bicinonínic (BCA). Aquest mètode requereix, a més a més, de la presència de coure. Els ponts peptídics tenen la capacitat de reduir el coure de la solució blavosa del sulfat de coure (Cu^{2+}) a Cu^{1+} . Per tant, la quantitat de coure reduït és proporcional a la quantitat de proteïnes en aquella solució. Aquest Cu^{1+} és quelat o acomplexat per dues molècules d'àcid bicinonínic, formant un compost de color porpra, que té un màxim d'absorció a 562nm. A temperatures de 37°C, els ponts peptídics participen també en la formació del complex de color porpra, augmentant l'especificitat i la sensibilitat del mètode. Es va emprar el kit de Pierce *BCA Protein Assay Reagent*. Bàsicament, aquest kit conté dues solucions (la solució A i la solució B; la B és blavosa pel sulfat de coure i se'n fa una dilució 1:50 en la A) que es barregen abans de realitzar la mesura. S'utilitzen 200µl d'aquesta barreja A+B per mostra. Amb això, en una placa d'ELISA de 96 pous, s'afegeixen, per duplicat, 0, 2, 5, 10, 15 i 20 µg d'Albúmina de sèrum boví (BSA a 2mg/ml, continguda en el kit) amb una micropipeta de 10µl (0; 1; 2,5; 5; 10 µl d'aquesta BSA). Posteriorment, es pipetegen per duplicat cada mostra: 2µl en el cas de mostres provinents de cèl·lules C2C12, amb una micropipeta de 2µl. Per últim, amb una multicanal, s'afegeixen ràpid els 200µl de reactiu A:B i es deixa reaccionar a 37°C durant 30'. Després d'aquest temps, es llegeix l'absorbància a 550nm amb un lector de plaques ELISA *Sunrise Remote/Touch screen de Tecan*. Es calcula l'equació de la recta patró amb les dilucions de BSA i s'obté el valor de concentració de proteïna en µg/µl substituint el valor de X de l'equació amb el valor d'absorbància obtingut i, posteriorment, es fa la mitjana dels valors de concentració obtinguts en els duplicats/triplicats.

7.3.3 *Western Blot*

Aquesta tècnica consisteix en la detecció d'una determinada proteïna, mitjançant l'ús d'un anticòs específic, en una membrana en la que s'han immobilitzat el conjunt de proteïnes presents en una mostra. Consta de tres passos:

- 1) Electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants.
- 2) Transferència de les proteïnes a membranes de PVDF.
- 3) Immunodetecció de la proteïna d'interès.

Electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants

L'electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE: *Sodium dodecylsulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) és una de les tècniques més utilitzades habitualment per separar proteïnes en funció de la seva massa molecular. El detergent SDS, present tant a la mostra com en el gel, s'uneix a les proteïnes, les desnaturalitza i els confereix una càrrega negativa proporcional a la seva massa. Això fa que quan la mostra proteica es sotmet a un camp elèctric les proteïnes migrin cap al pol positiu en funció del seu tamany. Per realitzar la SDS-PAGE s'utilitzen dos tipus de gels: el gel concentrador i el gel separador. El gel concentrador té un tamany de porus molt gran, ja que el seu percentatge d'acrilamida és només del 3,3%, i un pH de 6,8. Ambdues propietats faciliten que totes les proteïnes migrin a la mateixa velocitat i arribin al mateix temps al gel separador. Aquest fet augmenta la resolució de la separació segons el tamany de les proteïnes. En canvi, el percentatge d'acrilamida del gel separador varia en funció de la massa molecular de les proteïnes que ens interessa separar. Així, per proteïnes més grans de 80kDa el percentatge d'acrilamida òptim és del 7,5%, per proteïnes més petites de 30kDa seria del 15% i per proteïnes amb una massa molecular

compresa entre 110 i 37 kDa utilitzaríem gels separadors amb un 10% d'acrilamida. Aquest darrer percentatge ha estat el més usat en aquesta tesi doctoral.

El sistema d'electroforesi emprat en aquesta tesi ha estat el Mini-Protean de BioRad. En tots els casos s'han preparat gels de 1,5mm d'amplada. Es munten els vidres del sistema d'electroforesi segons les instruccions del fabricant. Primer es preparen 7,5 ml de la solució del gel separador. Cal tenir en compte que l'acrilamida no polimeritzada és neurotòxica i per tant, s'ha de manipular amb guants. La composició d'aquest gel és la següent: Acrilamida/Bisacrilamida (Pronadisa) al 7,5%, 10% o 15% d'acrilamida depenent del tamany de les proteïnes a separar, Tris-Base 0,375M; pH 8,8, SDS 0,1%, persulfat d'amoni 0,05 % i TEMED (BioRad) 2,2mM. Els dos darrers compostos s'afegeixen al final ja que són l'iniciador i el catalitzador de la polimerització, respectivament. Aquesta solució s'afegeix entre els dos vidres del sistema. Immediatament després s'afegeix 1ml d'aigua miliQ o 300µl d'isopropanol per eliminar les bombolles degudes al SDS, per anivellar la superfície del gel i per afavorir la seva polimerització aïllant-lo de l'oxigen atmosfèric. Un cop polimeritzat, s'elimina l'aigua miliQ o l'isopropanol per decantació i es preparen 2,5ml de la solució del gel concentrador. La seva composició és: Acrilamida/Bisacrilamida al 3,3 % d'acrilamida, Tris-HCl 0,125M; pH 6,8, SDS 0,1%, persulfat d'amoni 0,1% i TEMED 6,6mM. S'afegeix a sobre del gel separador ja polimeritzat i immediatament es col·loca la pinta submergint-la en el gel i deixant que aquest polimeritzi a temperatura ambient.

Per afavorir la desnaturalització de les proteïnes afegim tampó de càrrega de Laemmli o LSB (*Loading Sample Buffer*) a les mostres i les escalfem 5 minuts a 95°C. A part de la desnaturalització de les proteïnes deguda a l'elevada

temperatura, el tampó de Laemmli conté SDS, que també les desnaturalitza i els confereix la càrrega negativa necessària per dur a terme l'electroforesi. La composició del tampó de càrrega (LSB 4X) és la següent: Tris-HCl 0,4M; pH 6,8; glicerol 69,6%; SDS al 8% (p/v) i Blau de bromofenol 0,05mg/ml (que permet visualitzar la mostra en el gel). Aquesta solució és molt viscosa i s'ha de bullir per poder ser pipetejada. S'emmagatzema a temperatura ambient. Cal diluir-lo 1/4 en la mostra. A més, les proteïnes poden unir-se entre elles mitjançant ponts disulfur. Per tant, perquè les proteïnes migrin segons el seu pes molecular, és important trencar aquests ponts mitjançant la reducció dels mateixos amb DTT a una concentració final de 100mM. El DTT s'afegeix juntament amb el LSB abans de bullir les mostres. Un cop bullides, es poden carregar directament al gel o bé guardar-les a -80°C.

Es col·loquen els gels polimeritzats en el sistema d'electroforesi i s'omple la cubeta amb el tampó d'electroforesi. La composició d'aquest tampó és: Tris-Base 25mM, glicina 0,19M i SDS 0,1%. Es treuen les pintes i es carreguen tant les mostres de proteïna com un marcador de massa molecular pretenyit (*Prestained SDS-PAGE standards Broad Range*, BioRad) amb una xeringa Hamilton. Aquest marcador és molt important per calcular el pes molecular de la proteïna d'interès i per discriminar l'ordre de càrrega del gel. En els gels Mini Protean es poden carregar fins a 90µg de proteïna total, tot i que habitualment s'ha carregat 40µg. Es col·loca la tapa amb els elèctrodes, es connecta a una font d'alimentació i es duu a terme l'electroforesi a un voltatge constant de 150 V a temperatura ambient fins que comença a sortir el front de blau de bromofenol del gel. Aquest temps és aproximadament 1h 30' en el cas dels gels al 10% d'acrilamida. Finalment, es desmunta el sistema i es recupera el gel separador.

Transferència de les proteïnes a membranes de PVDF

Aquest procés permet transferir les proteïnes del gel a una membrana de nitrocel·lulosa o de PVDF, on queden immobilitzades per adsorció. En aquesta tesi s'han emprat membranes de PVDF *ImmobilonTM* (Millipore). La força que promou el pas de les proteïnes del gel a la membrana és l'aplicació d'un camp elèctric entre els dos. El protocol de la transferència és el següent:

- 1) Es prepara 1 litre de tampó de transferència que conté Tris-Base 25mM, glicina 0,19M pH 8,3 i metanol al 20%.
- 2) Es tallen 2 fragments de paper *Whatmann* 3MM per gel. El tamany ha de ser lleugerament inferior al de les esponges del casset de l'equip de transferència Mini Protean TransBlot Cell (BioRad). Es talla un tros de membrana de PVDF del mateix tamany que el gel (aproximadament 8,5x6cm) i s'activa en metanol absolut durant 1 minut.
- 3) Es submergeix tot el material (cassets, esponges, membrana, papers *Whatmann*) en tampó de transferència per equilibrar-lo.
- 4) El muntatge dels cassets de transferència es realitza en una safata amb tampó de transferència. Sobre la part negra del casset es col·loca en aquest ordre: una esponja, el paper *Whatmann* i el gel. Seguidament es disposa la membrana activada i s'eliminen les bombolles que puguin quedar entre el gel i la membrana. Es posa l'altre paper *Whatmann* a sobre la membrana, una altra esponja i es tanca el casset. És molt important l'orientació del casset, ja que les proteïnes carregades negativament per l'SDS aniran del pol negatiu (banda negra del casset i de la cubeta) al pol positiu (banda transparent del casset i cara vermella de la cubeta).
- 5) Es col·loquen els cassets a la cubeta i un bloc de gel per evitar un escalfament excessiu. S'omple la cubeta amb tampó de transferència i es connecta a la font d'alimentació. La transferència es duu a terme a un

amperatge constant de 250mA durant 1 hora i 40 minuts. Una vegada acabada, es desmunta el sistema, es recupera la membrana procurant que no s'assequi i s'inicia la immunodetecció.

6) Per comprovar l'eficiència de la transferència es pot tenyir el gel amb *Coomassie Brilliant Blue*. Alhora, aquest gel es pot emprar com a control de càrrega de proteïna total, ja que la transferència sempre és parcial i el *Coomassie* és prou sensible per a la detecció de la proteïna retinguda en el gel. Alternativament, la membrana es pot tenyir amb el colorant reversible de proteïnes *Ponceau*.

Immunodetecció de la proteïna d'interès

Aquest procés permet detectar específicament la proteïna d'interès a la membrana de PVDF on ha estat prèviament transferida. Consisteix bàsicament en quatre fases:

1) Es bloqueja la membrana amb una solució rica en proteïnes per evitar la unió inespecífica de l'anticòs primari al PVDF. En aquesta tesi les membranes han estat bloquejades amb PBS amb un 5% (p/v) de llet descremada, durant 1 hora i a temperatura ambient en agitació. Alternativament es pot realitzar durant 16 hores a 4°C.

2) S'incuba la membrana amb l'anticòs primari específic per la proteïna d'interès. S'incuba la membrana amb 5ml de la solució de l'anticòs primari durant 16 hores a 4°C, en agitació (tots els anticossos primaris utilitzats en aquesta tesi han estat diluïts en la solució de bloqueig). Després de la incubació es renta la membrana per eliminar l'excés d'anticòs primari. S'han realitzat 3 rentats de 10 minuts amb PBS-Tween 20 al 0,1% (v/v) a temperatura ambient, independentment de l'anticòs utilitzat.

3) S'incuba la membrana amb un anticòs secundari conjugat afí a l'anticòs primari utilitzat. Tots els anticòs secundaris emprats en aquesta tesi estaven conjugats amb peroxidasa de rave HRP (*Horse Radish Peroxidase*) i han estat adquirits a la companyia Jackson. La solució d'anticòs secundari s'ha preparat en PBS amb un 1% (p/v) de llet descremada, fent una dilució 1/10000 tant pel secundari que reconeix IgG de conill com pel que reconeix IgG de ratolí. La membrana s'incuba amb la solució d'anticòs secundari durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació. Transcorregut aquest temps es realitzen 3 rentats de 10 minuts amb PBS-Tween 20 al 0,1% (v/v), a temperatura ambient, per eliminar l'excés d'anticòs secundari.

4- Finalment i per tal de realitzar el revelat, s'incuba la membrana durant 1 minut amb el reactiu ECL (*Enhanced ChemioLuminiscence*; Amersham Biosciences). Tot seguit es col·loca en un casset d'exposició (Wolf) i, a la cambra fosca, es posa en contacte amb un film autoradiogràfic (Amersham Biosciences) a diferents temps d'exposició. Els films han estat revelats mitjançant un revelador automàtic *HyperProcessor Model AM4* (Amersham Pharmacia Biotech).

Un cop revelat el film es pot realitzar un anàlisi quantitatiu de les proteïnes detectades mitjançant densitometria. Per altra banda, si es vol utilitzar la membrana per a la immunodetecció d'una altra proteïna, es pot guardar en PBS a 4°C i sotmetre-la a un procés de *stripping*, que es basa en la desnaturalització per temperatura i agents reductors, dels anticòs presents a la membrana per poder-la incubar amb nous anticòs primaris.

7.3.4 Immunocitoquímica

Mitjançant la detecció de la proteïna eMHC per immunocitoquímica, es pot analitzar l'estructura dels miotubs C2C12 de Dia 4 i quantificar el número de nuclis que contenen. Els experiments es van realitzar directament en plaques de 6 pous. El protocol seguit és el següent:

- 1) S'aspira el medi i es realitzen dos rentats amb PBS. Seguidament, s'afegeix el volum necessari de formaldehid al 4% en PBS per cobrir i fixar totes les cèl·lules (1 ml en un pou d'una placa de 6 pous).
- 2) Es deixen durant 10 minuts a temperatura ambient.
- 3) Es realitzen dos rentats de 5 minuts amb PBS i aleshores es poden mantenir a 4°C fins el dia de la immunocitoquímica amb PBS-Azida sòdica al 0,02%.
- 4) El dia de l'experiment, es fa un nou rentat de 5 minuts amb PBS.
- 5) Es bloqueja 1h a temperatura ambient amb la solució de bloqueig (5% BSA i 5% HS en PBS-T).
- 6) S'aspira la solució de bloqueig i s'incuba o/n a 4°C amb l'anticòs eMHC, que no es dilueix perquè és un hibridoma.
- 7) Es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb PBS-T (0,1%).
- 8) S'incuba amb l'anticòs secundari 1h a temperatura ambient (biotil-goat-anti mouse, dilució 1/250 en PBS-T).
- 9) Es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb PBS-T (0,1%). Mentrestant, es prepara el Vectastain (20µl solució A i 20µl solució B per 1ml de PBS), ja que ha d'estar uns 20 minuts a temperatura ambient abans d'utilitzar-lo
- 10) S'incuben els miotubs durant 15 minuts amb la vectastain preparada anteriorment.
- 11) Es realitzen 3 rentats de 5 minuts amb PBS-T (0,1%).
- 12) Es realitzen 2 rentats més de 3 minuts amb PBS.

13) Finalment, es fa un revelatge amb DAB i quan es creu convenient (quan hi ha el color adequat, normalment al cap de 10 minuts), s'elimina. A partir d'aquí, s'afegeix PBS i s'obtenen les imatges al microscopi Nikon E600 equipat amb la càmera DP. El software d'adquisició va ser el Cell F (Olympus).

7.3.5 Anàlisi de la morfologia i de la dinàmica mitocondrial mitjançant proteïnes mitocondrials fluorescentes

Per realitzar aquest anàlisi, es va utilitzar una línia de mioblasts C2C12 que expressaven establenent la DsRed (vermella) amb una seqüència N-terminal (de la subunitat Cox8a humana) que la dirigia a la matriu mitocondrial (mtDsRed). Aquesta línia va ser generada per transducció lentiviral pel Dr Marc Liesa. Un cop obtinguda aquesta línia, el protocol que es va seguir va ser el següent:

- 1) Es van créixer els mioblasts C2C12 en cobreobjectes de 25 mm de diàmetre.
- 2) El dia de l'anàlisi de la dinàmica, s'agafava el cobreobjectes amb les cèl·lules vives i es col·locava ràpidament amb les pinces en un anell metàl·lic de *Molecular Probes*, que permetia el seu muntatge en el microscopi i, alhora, cobrir-lo de medi (amb la cara de les cèl·lules cara amunt, al contrari de l'objectiu del microscopi invertit). El medi era exactament el mateix que el medi de creixement però amb la particularitat que el DMEM no tenia roig fenol (el qual és molt autofluorescent i afectaria a la visibilitat del marcatge). És important estar segur que l'anell metàl·lic segella prou bé el cobreobjectes perquè no s'escapi el medi.
- 3) El microscopi confocal Leica SP2 tenia una platina calefactora (mantenia el cobreobjectes amb el medi a 37°C) i alhora una cambra que proporcionava l'atmosfera de 5% de CO₂ necessària. Un cop equilibrat el muntatge (esperant uns 5 minuts), es procedia a enfocar i seleccionar les cèl·lules amb l'objectiu de

63x augments, d'obertura 1.4 i amb oli d'immersió (tenint cura d'anar ràpid perquè les llums de la làmpada de mercuri són tòxiques).

4) Després de seleccionar el camp, per excitar la mtDsRed es va emprar el làser de 561nm a un percentatge molt baix (al voltant del 10%) , ja que és tòxic per les cèl·lules. Un cop ampliada la imatge amb el software (entre 2x-5x) i ajustat el voltatge del làser (el qual determina la intensitat amb la qual es visualitza el marcatge) es procedia a l'adquisició d'imatges. Aquesta adquisició es pot fer a diferents plans de l'eix Z o en un sol pla.

5) Un cop obtingudes les imatges, es va muntar el vídeo a través del software Fiji.

7.3.6 Anàlisi de la taxa de fusió mitocondrial mitjançant la mtPA-GFP

La mtPA-GFP és una proteïna fluorescent verda fotoactivable, és a dir, si s'irradia a 413nm, incrementa la seva intensitat 100 cops. Al tenir una seqüència COXIII que la dirigeix a la matriu mitocondrial, ens permet fotoactivar una única mitocòndria i monitoritzar la dilució de la GFP a mesura que es va fusionant amb altres mitocòndries. Per realitzar la fotoactivació, es va utilitzar un làser de 2 fotons (Chameleon 750nm), que permet molta precisió en la zona de fotoactivació, reduint d'aquesta manera la toxicitat. No obstant, s'han de tenir en compte molts factors, ja que si no es controlen correctament, poden generar artefactes. Els més importants són:

1) Anar amb compte amb la calibració de la intensitat del làser, ja que pots provocar un dany irreparable a la cèl·lula. Una intensitat de l'1-2% hauria de ser suficient.

2) Valorar la conveniència d'utilitzar el TMRE o no. Per una banda, es bo perquè pots controlar en tot moment si hi ha pèrdues en el potencial de membrana

durant l'experiment. Per una altra banda, és una toxicitat extra per la cèl·lula i a més, la seva fluorescència interfereix en la cerca de les cèl·lules transfectades.

- 3) Evitar una intensitat d'excitació excessivament forta amb el làser de 488nm, ja que pot sobreestimar el nivell de fusió mitocondrial.
- 4) Evitar la saturació després de la fotoactivació, ja que pot emascarar alguns esdeveniments de fusió.
- 5) Definir correctament el llinard, definint els píxels que han de ser inclosos en la quantificació de la intensitat al llarg del temps.

A continuació es mostra el procediment que es va utilitzar:

- 1) Es sembren en una placa 4400 mioblasts C2C12.
- 2) A les 8h, es transdueixen aquests mioblasts (400 MOI del miRctrl, miR1 O1 o miR1 M1)
- 3) Al cap de 24h, es fa un rentat amb PBS i es procedeix a fer una transfecció amb el plasmidi que conté la mtPA-GFP (veure apartat 7.1.7).
- 4) A les 72h de la transducció, es busquen cèl·lules positives al microscopi de fluorescència Zeiss LSM 710 LIVE, es fotoactiven les mitocondries i s'obtenen imatges per duplicat cada 15 minuts durant 45 minuts seguint les instruccions del protocol (Lovy et al. 2012). Els mioblasts es mantenen tota l'estona a 37°C i a 5% CO₂ utilitzant una cambra d'incubació de Zeiss.
- 5) Finalment, s'analitzen les imatges obtingudes utilitzant el *software MetaMorph*, on es quantifica la dilució de la GFP.

7.4 Estudis metabòlics en mioblasts C2C12

7.4.1 Experiments de respirometria

Per dur a terme els estudis de respirometria en mioblasts C2C12 s'ha utilitzat el *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience). Aquest aparell consta de dos sensors òptics capaços de mesurar la concentració d'oxigen i de protons del

medi extracel·lular. Aquest respiròmetre presenta múltiples avantatges: en primer lloc, permet la mesura del consum d'oxigen en cèl·lules adherides a la placa, sent particularment útil per l'anàlisi de cèl·lules diferenciades que perdrien la seva morfologia en ser tripsinitzades; en segon lloc, les mesures es realitzen en plaques de 24 pous, fet que permet dur a terme varies rèpliques en un mateix experiment; per últim, amb aquest instrument es pot mesurar simultàniament la taxa de consum d'oxigen (OCR) i la taxa d'acidificació del medi extracel·lular (ECAR). La OCR permet fer una estimació de la respiració mitocondrial. En tractar-se d'un mètode no invasiu, la mesura de l'OCR (i al mateix temps, de l'ECAR) es pot fer repetides vegades al llarg del temps, fet que permet l'addició seqüencial a les cèl·lules de diferents compostos, com desacoblants o inhibidors de la cadena respiratòria. El protocol està basat en l'addició successiva de diferents compostos que permet analitzar la taxa de consum d'oxigen en diferents estats respiratoris:

- **Estat R** (rutina): taxa de consum d'oxigen per part de les cèl·lules a partir dels substrats proporcionats pel propi medi de cultiu. Depèn de la demanda energètica cel·lular i del grau d'acoblament entre respiració i síntesi d'ATP. És la situació més semblant a la fisiològica, ja que no s'afegeix cap desacoblant ni inhibidor de la cadena respiratòria.
- **Estat L** (*leak*): taxa de consum d'oxigen cel·lular obtinguda en inhibir el complex V de la cadena de transport electrònic amb oligomicina. Ens dóna informació del consum d'oxigen no acoblat a la síntesi d'ATP.
- **Estat E**: taxa de consum d'oxigen cel·lular en desacoblar la cadena respiratòria de la síntesi d'ATP en addicionar FCCP. Aquest estat indica la capacitat màxima del sistema de transport d'electrons.
- **Estat rox** (*residual oxygen consumption*): taxa de consum d'oxigen no mitocondrial, estimada després d'afegir rotenona i antimicina A, inhibidors dels

complexes I i III, respectivament. Si volem expressar les OCR obtingudes en els diferents estats com a consum d'oxigen mitocondrial, es resta la taxa de consum d'oxigen en estat rox dels valors anteriors.

A l'hora de dissenyar l'experiment s'ha de tenir en compte que el sistema només permet afegir 4 compostos i que aquests han de ser permeables a la membrana plasmàtica. El número òptim de cèl·lules a sembrar inicialment, la concentració adient dels inhibidors i la durada de les mesures depenen del tipus cel·lular, i s'han de determinar en experiments previs. Així doncs, el protocol pels mioblasts C2C12 és el següent:

1) Un cop s'han transduït els mioblasts C2C12, es deixen fins a Dia 0. Aleshores, es tripsinitzen i es sembren 15000 cèl·lules/pou en una placa de 24 pous (Seahorse Bioscience). És important que les plaques siguin de la mateixa casa comercial que l'aparell perquè són les úniques compatibles. S'han de deixar 4 pous sense cèl·lules, que serviran de control negatiu i de control de la temperatura durant l'experiment. S'incuben les cèl·lules a 37°C durant 16 hores. També es posa en marxa l'aparell i es programa el protocol que es vol utilitzar. És convenient engegar-lo el dia abans perquè triga unes hores a assolir la temperatura adequada. També es prepara la placa de calibració amb 1ml/pou de líquid calibrador (Seahorse Bioscience). Aquesta placa, embolicada amb parafilm, es posa a una estufa a 37°C, on no es regulin els nivells de CO₂, durant 16 hores.

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

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

3) Es canvia el medi de les cèl·lules per 700µl de medi de mesura a cada pou i es deixa equilibrar la placa a 37°C i sense CO₂ durant 1 hora.

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

Port A: 75µl de la solució 10X d'oligomicina Concentració_{final} al pou = 1µg/ml

Port B: 75µl de la solució 10X de FCCP Concentració_{final} al pou = 1µM

Port C: 75µl de la solució 10X de rotenona Concentració_{final} al pou = 0,1µM

Port D: 75µl de la solució 10X d'antimicina A Concentració_{final} al pou = 0,1µM

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

6) Quan acaba la calibració, es canvia la placa de calibració per la placa amb les cèl·lules i s'inicia el protocol programat prèviament. Inicialment l'aparell fa 4 mesures corresponents a l'estat de rutina. Cada cicle de mesura consta de 4 minuts d'agitació, 2 minuts de repòs i 1,5 minuts de mesura. Seguidament, l'aparell injecta l'oligomicina (Port A) i fa 4 mesures. A continuació, injecta el FCCP (Port B) i torna a realitzar 4 cicles de mesura. Posteriorment, injecta la rotenona (Port C) i fa 4 mesures més. Finalment, s'injecta l'antimicina A (Port D) on realitza les últimes 4 mesures.

7) Un cop finalitzat el protocol, es treu la placa de l'aparell, es lisen les cèl·lules afegint a cada pou 20µl de tampó de lisi (0,1M NaOH i 1% SDS) i es determina la concentració de proteïnes mitjançant el mètode de l'àcid bicinonínic (Pierce).

La taxa de consum d'oxigen en cada estat s'expressa com a pmol O₂/min-µg de

proteïna. A partir d'aquests valors absoluts s'han calculat diferents *ratios* que ens donen informació sobre el grau d'acoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa:

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

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

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

7.4.2 Mesura de la producció d'anions superòxid mitocondrials

Per a realitzar aquest experiment, s'ha utilitzat la sonda MitoSOX (Life technologies), que és un fluoròfor vermell dirigit específicament a les mitocondries de cèl·lules vives. Els anions superòxid oxiden aquesta sonda, la qual produeix una intensa fluorescència vermella. A més, és altament selectiva, ja que no reacciona amb altres ROS ni espècies reactives de nitrogen (RNS). Així doncs, el protocol seguit va ser el següent:

- 1) Un cop s'han transduït els mioblasts C2C12, es deixen fins a Dia 0 o Dia 1.

- 2) S'incuben en medi de creixement que conté 5 μ M de MitoSOX durant 30 minuts a 37°C i a la foscor. Prèviament, s'ha dissolt un vial de MitoSOX que conté 50 μ g en 13 μ l de DMSO, per fer un stock de 5mM.
- 3) Seguidament es fan 2 rentats amb PBS (que conté 5mM CaCl₂ i 5mM MgCl₂ per eliminar la sonda extracel·lular).
- 4) Es tripsinitzen les cèl·lules i es resuspenen en 500 μ l de buffer FACS (PBS 1X amb 5mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 5mM glucosa i 1% BSA).
- 5) Finalment, s'analitza la seva fluorescència al citòmetre de flux analitzador Coulter XL (Unitat de Citometria de Flux dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona).

7.4.3 Mesura dels nivells de peròxid d'hidrogen mitocondrial i dels nivells de peròxid d'hidrogen en lisats totals

En primer lloc, es van mesurar els nivells de peròxid d'hidrogen en lisats tots de mioblasts C2C12 a Dia 0 utilitzant la sonda *AmplexRed* (Life Technologies). En presència de peroxidasa, l'*AmplexRed* reacciona amb el peròxid d'hidrogen estequiòmicament (1:1), produint un producte d'oxidació vermell fluorescent, la resofurina. Aquest experiment es va realitzar al espectrofotòmetre, seguint exactament el protocol proporcionat i llegint l'absorbància en un lector de plaques ELISA *Sunrise Remote/Touch screen* de Tecan.

Per una altra banda, es van mesurar els nivells de peròxid d'hidrogen mitocondrials en mioblasts C2C12 de Dia 0 '*in vivo*', utilitzant un adenovirus que conté la mitoHyPer. La mitoHyPer és el resultat d'afegir dues còpies d'una seqüència d'import a la mitocòndria a l'N-ter de la HyPer. Mitjançant aquest mètode, detectem ratiomètricament els nivells mitocondrials de peròxid d'hidrogen amb una alta selectivitat i sensibilitat. A més, no necessita cap

compost químic exogen. El protocol seguit va ser el que es mostra a continuació:

- 1) Es sembren en una placa dividida en 4 quadrants, 4400 mioblasts C2C12 per quadrant.
- 2) A les 8h, es procedeix a fer una doble transducció (400 MOI del miRctrl, miR1 O1 o miR1 M1 i 600000 MOI de l'Ad-mitoHyPer).
- 3) Al cap de 48h, es fa un rentat amb PBS i s'afegeix medi fresc de creixement.
- 4) Seguidament, s'obtenen imatges al microscopi de fluorescència Zeiss LSM 710 LIVE utilitzant dues ones d'excitació diferents (405nm i 488nm) amb una única emissió a 495nm. Els mioblasts es mantenen tota l'estona a 37°C i 5% CO₂ utilitzant una cambra d'incubació de Zeiss.
- 5) Finalment, s'analitzen utilitzant el *software MetaMorph*, on quantifiquem els nivells de peròxid d'hidrogen fent la relació de fluorescència 488/405.

7.4.4 Mesura del potencial de membrana mitocondrial

Per realitzar aquests experiments, s'ha utilitzat la sonda catiònica TMRM (Life technologies), que s'acumula als mitocondris en funció del seu potencial de membrana. En ser una sonda fluorescent (presenta una longitud d'ona d'excitació d'uns 540nm i una longitud d'ona d'emissió d'uns 573nm) la seva incorporació es pot detectar i quantificar mitjançant citometria de flux. Així, la intensitat de fluorescència detectada serà més gran com més elevat sigui el potencial de membrana mitocondrial. Paral·lelament, per tal de validar les mesures, s'utilitza el desacoblant CCCP (Sigma) que dissipa el potencial de membrana mitocondrial i per tant, disminueix la incorporació de la sonda i els valors de fluorescència. Ens permet avaluar la fluorescència deguda a la unió no específica de la sonda. Les solucions *stock* de la sonda TMRM i de CCCP es preparen en DMSO, a unes concentracions respectives de 500µM i de 100mM, i

es guarden congelades a -20°C protegides de la llum. Les incubacions de les cèl·lules amb la sonda s'han fet en plaques de 6 pous, així que els volums són els adequats per aquest tipus de pous. El protocol seguit és el següent:

1) Es renten les cèl·lules amb PBS. S'afegeix 1ml per pou de medi de diferenciació \pm CCCP a una concentració final de $20\mu\text{M}$ i s'incuben durant 30 minuts a 37°C . S'han fet sempre duplicats per cada condició.

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

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

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

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

7.5 Anàlisi de l'activitat transcripcional mitjançant assaigs luciferasa

Tots els experiments realitzats per mesurar l'activitat transcripcional dels diferents promotors, s'han dirigit a la transcripció de l'enzim luciferasa. La luciferasa és un enzim que oxida la luciferina a oxiluciferina. Aquesta oxidació genera fotons de llum i, per tant, pot ser detectada i quantificada mitjançant un luminòmetre. Es va emprar el sistema de Promega *Dual-Luciferase® Reporter Assay System*, que conté una solució amb tots els reactius necessaris perquè la luciferasa present en un lisat cel·lular catalitzi aquesta reacció d'oxidació i

generi fotons detectables. Aquest kit, ahora, conté una segona solució amb el substrat específic de l'enzim renilla, del qual també es pot mesurar la seva activitat en la mateixa mostra on hi ha luciferasa (després d'haver mesurat i aturat la reacció de la luciferasa amb inhibidors presents en la solució del substrat de la renilla), ja que la reacció catalitzada per la renilla també genera fotons. Amb això, en tots els mioblasts C2C12 on vam transfectar els diferents plasmidis, també es va cotransfectar el plasmidi codificant per Renilla (pRL-CMV). D'aquesta manera, l'activitat de Renilla ens permetia corregir les variacions en l'activitat luciferasa degudes a diferències en les eficiències de transfecció. El procediment d'aquesta metodologia va ser el següent:

- 1) Un cop s'han transduït els mioblasts C2C12, es deixen fins a Dia 0.
- 2) Aleshores, es tripsinitzen i es sembren 50.800 cèl·lules per pou de 24w.
- 3) A les 6h, es transfecta 1µg de DNA total per pou mitjançant Lipofectamina 2000. En funció de l'experiment, es van utilitzar les següents proporcions:
 - 0,9µg pGL2basic-184bpMyogenin + 0,1µg pRL-CMV
 - 0,45µg GAL4BD + 0,45µg GAL4DBD-MyoD + 0,1µg pRL-CMV
 - 0,9µg p3kB + 0,1µg pRL-CMV
- 3) A les 24 hores post-transfecció, es va rentar la placa de 24 pous amb PBS i es van obtenir lisats totals de cada pou seguint les especificacions del producte (amb 50µl del tampó de lisis del kit).
- 4) Un cop obtinguts els lisats, es van afegir 20µl dels mateixos a cada tub d'assaig. Un cop situats en el luminòmetre dels Serveis Científics Comuns del Parc Científic de Barcelona, s'afegien els 20µl de substrat de la luciferasa a cada tub (es pujava i es baixava el substrat amb la pipeta 3 cops, per barrejar-lo amb el lisat) i es mesurava l'activitat al luminòmetre just després d'afegir el substrat. És important que aquesta seqüència de temps sigui la mateixa per tots els tubs (el temps d'afegir el substrat i mesurar).

5) Després d'haver mesurat l'activitat luciferasa en totes les mostres, es va procedir a mesurar l'activitat renilla en els mateixos tubs. Es realitzava addicionant 20µl del reactiu *Stop & Glo* del kit per tub, que aturava la reacció luciferasa i tenia els substrats necessaris per la renilla. Es barrejava i es mesurava de la mateixa manera que la luciferasa.

6) Els valors d'activitat per cada mostra s'expressen com la relació entre l'activitat luciferasa i l'activitat renilla.

7.6 Estudis de regeneració muscular

En aquesta tesi doctoral s'han realitzat assajos de regeneració muscular per tal d'avaluar si la pèrdua de funció de Opa1 produïa alteracions en la formació de noves fibres. Per tant, per tal d'induir la regeneració, es va injectar cardiotoxina (Latoxan) als gastrocnemis dels ratolins. La cardiotoxina causa la mort de les fibres musculars i posa en marxa un procés inflamatori i de reemplaçament d'aquestes fibres. Els ratolins es van anestesià amb una injecció intraperitoneal de 80/10 mg/kg ketamina/xilacina i es va rasurar el pèl de la zona on es troba el gastrocnemi. A continuació es va realitzar una única injecció intramuscular de 75µl d'una dilució de cardiotoxna 1µM en 0,9% NaCl en cada gastrocnemi. Dos dies després, es van transduir el màxim de cèl·lules satèl·lit mitjançant la injecció intramuscular de 75µl d'una solució que contenia de l'ordre de 10^{10} adenovirus recombinants. Finalment, es van extreure el músculs a 9, 12 o 22 dies després de causar la lesió inicial per avaluar el procés de regeneració muscular mitjançant una tinció Hematoxilina-Eosina.

7.6.1 Preparació histològica

Per tal de realitzar els diferents anàlisis histològics, els músculs un cop extrets dels ratolins es submergien en OCT (Tissue-Tek) i es congelaven posant-los en isopentà refredat en nitrogen líquid. Un cop congelats els blocs, es guardaven a

-80°C fins a obtenir-ne crioseccions de 10µm de gruix que es posaven en portaobjectes prèviament tractats amb gelatina al 0,5%. Aquestes preparacions es guardaven també a -80°C fins a realitzar la tinció Hematoxilina-Eosina (H&E).

7.6.2 Tinció Hematoxilina-Eosina

Aquesta tinció s'ha utilitzat per analitzar la morfologia dels músculs a nivell histològic. Els passos que es van seguir es mostren a continuació:

- 1) Es deixaven descongelar les preparacions i es fixaven els talls en acetona a -20°C entre 5 i 20 minuts.
- 2) Es submergien les seccions en Hematoxilina de Harris prèviament filtrada durant 10 minuts.
- 3) Es rentaven les preparacions durant 5 minuts en aigua corrent.
- 4) Es diferenciaven en alcohol àcid (aquest es preparava afegint 300µl d'HCl 37% comercial en 300ml d'etanol 80%) fent tres immersions ràpides.
- 5) Es tornaven a rentar durant 5 minuts en aigua corrent i es feien 3 immersions en aigua amoniacal (1,2ml d'amoníac pur en 300ml d'aigua destil·lada).
- 6) Es rentaven de nou en aigua corrent durant 5 minuts.
- 7) Es passaven els portaobjectes ràpidament per etanol 70% i es deixaven 5 minuts en Eosina de Meter que també es filtrava.
- 8) Per realitzar els passos de deshidratació es submergien els portes en etanol 70% durant 30 segons i dos vegades més en etanol 96% també durant 30 segons cada cop.
- 9) A continuació es submergien els portes durant 5 minuts en les següents solucions: 2x etanol 100%, 1x etanol/xilol al 50% cadascun, 2x xilol pur.
- 10) Finalment, les preparacions es muntaven en DPX (Sigma). Les imatges d'aquestes tincions es van obtenir amb el microscopi Nikon E600 equipat amb la càmera DP. El software d'adquisició va ser el Cell F (Olympus).

BIBLIOGRAFIA

8 BIBLIOGRAFIA

- Abe, J, and B C Berk. 1998. "Reactive Oxygen Species as Mediators of Signal Transduction in Cardiovascular Disease." *Trends in Cardiovascular Medicine* 8 (2) (February): 59–64. doi:10.1016/S1050-1738(97)00133-3.
- Acín-Pérez, Rebeca, Patricio Fernández-Silva, Maria Luisa Peleato, Acisclo Pérez-Martos, and Jose Antonio Enriquez. 2008. "Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes." *Molecular Cell* 32 (4) (November 21): 529–539. doi:10.1016/j.molcel.2008.10.021.
- Akepati, Vasudheva Reddy, Eva-Christina Müller, Albrecht Otto, Holger M Strauss, Michael Portwich, and Christiane Alexander. 2008. "Characterization of OPA1 Isoforms Isolated from Mouse Tissues." *Journal of Neurochemistry* 106 (1) (July): 372–383. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05401.x.
- Alavi, Marcel V, Stefanie Bette, Simone Schimpf, Frank Schuettauf, Ulrich Schraermeyer, Hans F Wehrl, Lukas Ruttiger, et al. 2007. "A Splice Site Mutation in the Murine Opa1 Gene Features Pathology of Autosomal Dominant Optic Atrophy." *Brain: A Journal of Neurology* 130 (Pt 4) (April): 1029–1042. doi:10.1093/brain/awm005.
- Alexander, C, M Votruba, U E Pesch, D L Thiselton, S Mayer, A Moore, M Rodriguez, et al. 2000. "OPA1, Encoding a Dynamin-Related GTPase, Is Mutated in Autosomal Dominant Optic Atrophy Linked to Chromosome 3q28." *Nature Genetics* 26 (2) (October): 211–215. doi:10.1038/79944.
- Amati-Bonneau, Patrizia, Maria Lucia Valentino, Pascal Reynier, Maria Esther Gallardo, Belén Bornstein, Anne Boissière, Yolanda Campos, et al. 2008. "OPA1 Mutations Induce Mitochondrial DNA Instability and Optic Atrophy 'plus' Phenotypes." *Brain: A Journal of Neurology* 131 (Pt 2) (February): 338–351. doi:10.1093/brain/awm298.
- Anesti, Vasiliki, and Luca Scorrano. 2006. "The Relationship between Mitochondrial Shape and Function and the Cytoskeleton." *Biochimica et Biophysica Acta* 1757 (5-6) (June): 692–699. doi:10.1016/j.bbabi.2006.04.013.
- Arnoult, Damien, Alain Grodet, Yang-Ja Lee, Jérôme Estaquier, and Craig Blackstone. 2005. "Release of OPA1 during Apoptosis Participates in the Rapid and Complete Release of Cytochrome c and Subsequent Mitochondrial Fragmentation." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (42) (October 21): 35742–35750. doi:10.1074/jbc.M505970200.

- Bach, Daniel, Deborah Naon, Sara Pich, Francesc X Soriano, Nathalie Vega, Jennifer Rieusset, Martine Laville, et al. 2005. "Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle: Effects of Type 2 Diabetes, Obesity, Weight Loss, and the Regulatory Role of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-6." *Diabetes* 54 (9) (September): 2685–2693.
- Bach, Daniel, Sara Pich, Francesc X Soriano, Nathalie Vega, Bernhard Baumgartner, Josep Oriola, Jens R Daugaard, et al. 2003. "Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and Mitochondrial Metabolism. A Novel Regulatory Mechanism Altered in Obesity." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (19) (May 9): 17190–17197. doi:10.1074/jbc.M212754200.
- Bakeeva, L E, Chentsov YuS, and V P Skulachev. 1978. "Mitochondrial Framework (reticulum Mitochondriale) in Rat Diaphragm Muscle." *Biochimica et Biophysica Acta* 501 (3) (March 13): 349–369.
- Bay, Denice C, and Deborah A Court. 2002. "Origami in the Outer Membrane: The Transmembrane Arrangement of Mitochondrial Porins." *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire* 80 (5): 551–562.
- Benard, Giovanni, Nadège Bellance, Dominic James, Philippe Parrone, Helder Fernandez, Thierry Letellier, and Rodrigue Rossignol. 2007. "Mitochondrial Bioenergetics and Structural Network Organization." *Journal of Cell Science* 120 (Pt 5) (March 1): 838–848. doi:10.1242/jcs.03381.
- Benezra, R, R L Davis, D Lockshon, D L Turner, and H Weintraub. 1990. "The Protein Id: A Negative Regulator of Helix-Loop-Helix DNA Binding Proteins." *Cell* 61 (1) (April 6): 49–59.
- Bereiter-Hahn, J, and M Vöth. 1994. "Dynamics of Mitochondria in Living Cells: Shape Changes, Dislocations, Fusion, and Fission of Mitochondria." *Microscopy Research and Technique* 27 (3) (February 15): 198–219. doi:10.1002/jemt.1070270303.
- Brand, M D. 1990. "The Proton Leak across the Mitochondrial Inner Membrane." *Biochimica et Biophysica Acta* 1018 (2-3) (July 25): 128–133.
- Brand, M D. 2000. "Uncoupling to Survive? The Role of Mitochondrial Inefficiency in Ageing." *Experimental Gerontology* 35 (6-7) (September): 811–820.

- Brand, M D, L F Chien, E K Ainscow, D F Rolfe, and R K Porter. 1994. "The Causes and Functions of Mitochondrial Proton Leak." *Biochimica et Biophysica Acta* 1187 (2) (August 30): 132–139.
- Brandt, U. 1997. "Proton-Translocation by Membrane-Bound NADH:ubiquinone-Oxidoreductase (complex I) through Redox-Gated Ligand Conduction." *Biochimica et Biophysica Acta* 1318 (1-2) (January 16): 79–91.
- Braun, T, M A Rudnicki, H H Arnold, and R Jaenisch. 1992. "Targeted Inactivation of the Muscle Regulatory Gene Myf-5 Results in Abnormal Rib Development and Perinatal Death." *Cell* 71 (3) (October 30): 369–382.
- Brooks, Craig, Qingqing Wei, Leping Feng, Guie Dong, Yanmei Tao, Lin Mei, Zi-Jian Xie, and Zheng Dong. 2007. "Bak Regulates Mitochondrial Morphology and Pathology during Apoptosis by Interacting with Mitofusins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (28) (July 10): 11649–11654. doi:10.1073/pnas.0703976104.
- Cabezón, Elena, Martin G Montgomery, Andrew G W Leslie, and John E Walker. 2003. "The Structure of Bovine F1-ATPase in Complex with Its Regulatory Protein IF1." *Nature Structural Biology* 10 (9) (September): 744–750. doi:10.1038/nsb966.
- Caffin, F, A Prola, J Piquereau, M Novotova, D J David, A Garnier, D Fortin, et al. 2013. "Altered Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis but Improved Endurance Capacity in Trained OPA1-Deficient Mice." *The Journal of Physiology* 591 (Pt 23) (December 1): 6017–6037. doi:10.1113/jphysiol.2013.263079.
- Cereghetti, G M, and L Scorrano. 2006. "The Many Shapes of Mitochondrial Death." *Oncogene* 25 (34) (August 7): 4717–4724. doi:10.1038/sj.onc.1209605.
- Chargé, Sophie B P, and Michael A Rudnicki. 2004. "Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration." *Physiological Reviews* 84 (1) (January): 209–238. doi:10.1152/physrev.00019.2003.
- Chen, Hsiuchen, and David C Chan. 2009. "Mitochondrial Dynamics--Fusion, Fission, Movement, and Mitophagy--in Neurodegenerative Diseases." *Human Molecular Genetics* 18 (R2) (October 15): R169–176. doi:10.1093/hmg/ddp326.
- Chen, Hsiuchen, Anne Chomyn, and David C Chan. 2005. "Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction." *The Journal*

- of Biological Chemistry* 280 (28) (July 15): 26185–26192. doi:10.1074/jbc.M503062200.
- Chen, Hsiuchen, Scott A Detmer, Andrew J Ewald, Erik E Griffin, Scott E Fraser, and David C Chan. 2003. “Mitofusins Mfn1 and Mfn2 Coordinately Regulate Mitochondrial Fusion and Are Essential for Embryonic Development.” *The Journal of Cell Biology* 160 (2) (January 20): 189–200. doi:10.1083/jcb.200211046.
- Chen, Hsiuchen, J Michael McCaffery, and David C Chan. 2007. “Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum.” *Cell* 130 (3) (August 10): 548–562. doi:10.1016/j.cell.2007.06.026.
- Chen, Hsiuchen, Marc Vermulst, Yun E Wang, Anne Chomyn, Tomas A Prolla, J Michael McCaffery, and David C Chan. 2010. “Mitochondrial Fusion Is Required for mtDNA Stability in Skeletal Muscle and Tolerance of mtDNA Mutations.” *Cell* 141 (2) (April 16): 280–289. doi:10.1016/j.cell.2010.02.026.
- Chen, Yu-Chan, Eric B Taylor, Noah Dephoure, Jin-Mi Heo, Aline Tonhato, Ioanna Papandreou, Nandita Nath, Nicolas C Denko, Steven P Gygi, and Jared Rutter. 2012. “Identification of a Protein Mediating Respiratory Supercomplex Stability.” *Cell Metabolism* 15 (3) (March 7): 348–360. doi:10.1016/j.cmet.2012.02.006.
- Chung, J G, K T Yeh, S L Wu, N Y Hsu, G W Chen, Y W Yeh, and H C Ho. 2001. “Novel Transmembrane GTPase of Non-Small Cell Lung Cancer Identified by mRNA Differential Display.” *Cancer Research* 61 (24) (December 15): 8873–8879.
- Cipolat, Sara, Olga Martins de Brito, Barbara Dal Zilio, and Luca Scorrano. 2004. “OPA1 Requires Mitofusin 1 to Promote Mitochondrial Fusion.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (45) (November 9): 15927–15932. doi:10.1073/pnas.0407043101.
- Cipolat, Sara, Tomasz Rudka, Dieter Hartmann, Veronica Costa, Lutgarde Serneels, Katleen Craessaerts, Kristine Metzger, et al. 2006. “Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling.” *Cell* 126 (1) (July 14): 163–175. doi:10.1016/j.cell.2006.06.021.
- Cogliati, Sara, Christian Frezza, Maria Eugenia Soriano, Tatiana Varanita, Ruben Quintana-Cabrera, Mauro Corrado, Sara Cipolat, et al. 2013. “Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain

- Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency." *Cell* 155 (1) (September 26): 160–171. doi:10.1016/j.cell.2013.08.032.
- Criscuolo, Francois, and Frederic Bouillaud. 2009. "Free Radicals Run in Lizard Families: A Mitochondrial Uncoupling Phenomenon or Not?" *Biology Letters* 5 (3) (June 23): 343–344. doi:10.1098/rsbl.2009.0047.
- Davies, Karen M, Mike Strauss, Bertram Daum, Jan H Kief, Heinz D Osiewacz, Adriana Rycovska, Volker Zickermann, and Werner Kühlbrandt. 2011. "Macromolecular Organization of ATP Synthase and Complex I in Whole Mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (34) (August 23): 14121–14126. doi:10.1073/pnas.1103621108.
- Davies, Vanessa J, Andrew J Hollins, Malgorzata J Piechota, Wanfen Yip, Jennifer R Davies, Kathryn E White, Phillip P Nicols, Michael E Boulton, and Marcela Votruba. 2007. "Opa1 Deficiency in a Mouse Model of Autosomal Dominant Optic Atrophy Impairs Mitochondrial Morphology, Optic Nerve Structure and Visual Function." *Human Molecular Genetics* 16 (11) (June 1): 1307–1318. doi:10.1093/hmg/ddm079.
- Delettre, C, J M Griffoin, J Kaplan, H Dollfus, B Lorenz, L Faivre, G Lenaers, P Belenguer, and C P Hamel. 2001. "Mutation Spectrum and Splicing Variants in the OPA1 Gene." *Human Genetics* 109 (6) (December): 584–591. doi:10.1007/s00439-001-0633-y.
- Delettre, C, G Lenaers, J M Griffoin, N Gigarel, C Lorenzo, P Belenguer, L Pelloquin, et al. 2000. "Nuclear Gene OPA1, Encoding a Mitochondrial Dynamin-Related Protein, Is Mutated in Dominant Optic Atrophy." *Nature Genetics* 26 (2) (October): 207–210. doi:10.1038/79936.
- Delettre, Cécile, Guy Lenaers, Laetitia Pelloquin, Pascale Belenguer, and Christian P Hamel. 2002. "OPA1 (Kjer Type) Dominant Optic Atrophy: A Novel Mitochondrial Disease." *Molecular Genetics and Metabolism* 75 (2) (February): 97–107. doi:10.1006/mgme.2001.3278.
- DeVay, Rachel M, Lenin Dominguez-Ramirez, Laura L Lackner, Suzanne Hoppins, Henning Stahlberg, and Jodi Nunnari. 2009. "Coassembly of Mgm1 Isoforms Requires Cardiolipin and Mediates Mitochondrial Inner Membrane Fusion." *The Journal of Cell Biology* 186 (6) (September 21): 793–803. doi:10.1083/jcb.200906098.
- Doctrow, Susan R, Karl Huffman, Catherine Bucay Marcus, Georges Tocco, Evelyne Malfroy, Christy A Adinolfi, Henry Kruk, et al. 2002. "Salen-Manganese Complexes as Catalytic Scavengers of Hydrogen Peroxide

- and Cytoprotective Agents: Structure-Activity Relationship Studies.” *Journal of Medicinal Chemistry* 45 (20) (September 26): 4549–4558.
- Dröge, Wulf. 2002. “Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function.” *Physiological Reviews* 82 (1) (January): 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
- Dudkina, Natalya V, Stephanie Sunderhaus, Egbert J Boekema, and Hans-Peter Braun. 2008. “The Higher Level of Organization of the Oxidative Phosphorylation System: Mitochondrial Supercomplexes.” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40 (5) (October): 419–424. doi:10.1007/s10863-008-9167-5.
- Duvezin-Caubet, Stéphane, Ravi Jagasia, Johannes Wagener, Sabine Hofmann, Aleksandra Trifunovic, Anna Hansson, Anne Chomyn, et al. 2006. “Proteolytic Processing of OPA1 Links Mitochondrial Dysfunction to Alterations in Mitochondrial Morphology.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (49) (December 8): 37972–37979. doi:10.1074/jbc.M606059200.
- Duvezin-Caubet, Stéphane, Mirko Koppen, Johannes Wagener, Michael Zick, Lars Israel, Andrea Bernacchia, Ravi Jagasia, et al. 2007. “OPA1 Processing Reconstituted in Yeast Depends on the Subunit Composition of the M-AAA Protease in Mitochondria.” *Molecular Biology of the Cell* 18 (9) (September): 3582–3590. doi:10.1091/mbc.E07-02-0164.
- Ehses, Sarah, Ines Raschke, Giuseppe Mancuso, Andrea Bernacchia, Stefan Geimer, Daniel Tondera, Jean-Claude Martinou, Benedikt Westermann, Elena I Rugarli, and Thomas Langer. 2009. “Regulation of OPA1 Processing and Mitochondrial Fusion by M-AAA Protease Isoenzymes and OMA1.” *The Journal of Cell Biology* 187 (7) (December 28): 1023–1036. doi:10.1083/jcb.200906084.
- Elachouri, Ghizlane, Sara Vidoni, Claudia Zanna, Alexandre Pattyn, Hassan Boukhaddaoui, Karen Gaget, Patrick Yu-Wai-Man, et al. 2011. “OPA1 Links Human Mitochondrial Genome Maintenance to mtDNA Replication and Distribution.” *Genome Research* 21 (1) (January): 12–20. doi:10.1101/gr.108696.110.
- Fernández-Silva, Patricio, José A Enriquez, and Julio Montoya. 2003. “Replication and Transcription of Mammalian Mitochondrial DNA.” *Experimental Physiology* 88 (1) (January): 41–56.
- Ferré, Marc, Patrizia Amati-Bonneau, Yves Tourmen, Yves Malthièry, and Pascal Reynier. 2005. “eOPA1: An Online Database for OPA1 Mutations.” *Human Mutation* 25 (5) (May): 423–428. doi:10.1002/humu.20161.

- Ferree, Andrew W, Kyle Trudeau, Eden Zik, Ilan Y Benador, Gilad Twig, Roberta A Gottlieb, and Orian S Shirihai. 2013. "MitoTimer Probe Reveals the Impact of Autophagy, Fusion, and Motility on Subcellular Distribution of Young and Old Mitochondrial Protein and on Relative Mitochondrial Protein Age." *Autophagy* 9 (11) (November 1): 1887–1896. doi:10.4161/auto.26503.
- Frank, S, B Gaume, E S Bergmann-Leitner, W W Leitner, E G Robert, F Catez, C L Smith, and R J Youle. 2001. "The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis." *Developmental Cell* 1 (4) (October): 515–525.
- Frezza, Christian, Sara Cipolat, Olga Martins de Brito, Massimo Micaroni, Galina V Beznoussenko, Tomasz Rudka, Davide Bartoli, et al. 2006. "OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion." *Cell* 126 (1) (July 14): 177–189. doi:10.1016/j.cell.2006.06.025.
- Futai, M, T Noumi, and M Maeda. 1989. "ATP Synthase (H⁺-ATPase): Results by Combined Biochemical and Molecular Biological Approaches." *Annual Review of Biochemistry* 58: 111–136. doi:10.1146/annurev.bi.58.070189.000551.
- Gandre-Babbe, Shilpa, and Alexander M van der Blik. 2008. "The Novel Tail-Anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells." *Molecular Biology of the Cell* 19 (6) (June): 2402–2412. doi:10.1091/mbc.E07-12-1287.
- Griparic, Lorena, Takayuki Kanazawa, and Alexander M van der Blik. 2007. "Regulation of the Mitochondrial Dynamin-like Protein Opa1 by Proteolytic Cleavage." *The Journal of Cell Biology* 178 (5) (August 27): 757–764. doi:10.1083/jcb.200704112.
- Guillery, Olwenn, Florence Malka, Thomas Landes, Emmanuelle Guillou, Craig Blackstone, Anne Lombès, Pascale Belenguer, Damien Arnoult, and Manuel Rojo. 2008. "Metalloprotease-Mediated OPA1 Processing Is Modulated by the Mitochondrial Membrane Potential." *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 100 (5) (May): 315–325. doi:10.1042/BC20070110.
- Guttridge, D C, M W Mayo, L V Madrid, C Y Wang, and A S Baldwin Jr. 2000. "NF-kappaB-Induced Loss of MyoD Messenger RNA: Possible Role in Muscle Decay and Cachexia." *Science (New York, N.Y.)* 289 (5488) (September 29): 2363–2366.

- Hackenbrock, C R, B Chazotte, and S S Gupte. 1986. "The Random Collision Model and a Critical Assessment of Diffusion and Collision in Mitochondrial Electron Transport." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 18 (5) (October): 331–368.
- Hägerhäll, C. 1997. "Succinate: Quinone Oxidoreductases. Variations on a Conserved Theme." *Biochimica et Biophysica Acta* 1320 (2) (June 13): 107–141.
- Hales, K G, and M T Fuller. 1997. "Developmentally Regulated Mitochondrial Fusion Mediated by a Conserved, Novel, Predicted GTPase." *Cell* 90 (1) (July 11): 121–129.
- Halliwell, Barry. 2012. "Free Radicals and Antioxidants: Updating a Personal View." *Nutrition Reviews* 70 (5) (May): 257–265. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.
- Hasty, P, A Bradley, J H Morris, D G Edmondson, J M Venuti, E N Olson, and W H Klein. 1993. "Muscle Deficiency and Neonatal Death in Mice with a Targeted Mutation in the Myogenin Gene." *Nature* 364 (6437) (August 5): 501–506. doi:10.1038/364501a0.
- Hayden, Matthew S, and Sankar Ghosh. 2008. "Shared Principles in NF-kappaB Signaling." *Cell* 132 (3) (February 8): 344–362. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020.
- Hernández-Alvarez, María Isabel, José C Paz, David Sebastián, Juan Pablo Muñoz, Marc Liesa, Jessica Segalés, Manuel Palacín, and Antonio Zorzano. 2013. "Glucocorticoid Modulation of Mitochondrial Function in Hepatoma Cells Requires the Mitochondrial Fission Protein Drp1." *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (4) (August 1): 366–378. doi:10.1089/ars.2011.4269.
- Hernández-Alvarez, María Isabel, Hood Thabit, Nicole Burns, Syed Shah, Imad Brema, Mensud Hatunic, Francis Finucane, et al. 2010. "Subjects with Early-Onset Type 2 Diabetes Show Defective Activation of the Skeletal Muscle PGC-1{alpha}/Mitofusin-2 Regulatory Pathway in Response to Physical Activity." *Diabetes Care* 33 (3) (March): 645–651. doi:10.2337/dc09-1305.
- Hudson, Gavin, Patrizia Amati-Bonneau, Emma L Blakely, Joanna D Stewart, Langping He, Andrew M Schaefer, Philip G Griffiths, et al. 2008. "Mutation of OPA1 Causes Dominant Optic Atrophy with External Ophthalmoplegia, Ataxia, Deafness and Multiple Mitochondrial DNA Deletions: A Novel Disorder of mtDNA Maintenance." *Brain: A Journal*

- of Neurology* 131 (Pt 2) (February): 329–337. doi:10.1093/brain/awm272.
- Ishihara, Naotada, Yuu Fujita, Toshihiko Oka, and Katsuyoshi Mihara. 2006. “Regulation of Mitochondrial Morphology through Proteolytic Cleavage of OPA1.” *The EMBO Journal* 25 (13) (July 12): 2966–2977. doi:10.1038/sj.emboj.7601184.
- Ishihara, Naotada, Masatoshi Nomura, Akihiro Jofuku, Hiroki Kato, Satoshi O Suzuki, Keiji Masuda, Hidenori Otera, et al. 2009. “Mitochondrial Fission Factor Drp1 Is Essential for Embryonic Development and Synapse Formation in Mice.” *Nature Cell Biology* 11 (8) (August): 958–966. doi:10.1038/ncb1907.
- Jones, B A, and W L Fangman. 1992. “Mitochondrial DNA Maintenance in Yeast Requires a Protein Containing a Region Related to the GTP-Binding Domain of Dynamin.” *Genes & Development* 6 (3) (March): 380–389.
- Jones, N C, Y V Fedorov, R S Rosenthal, and B B Olwin. 2001. “ERK1/2 Is Required for Myoblast Proliferation but Is Dispensable for Muscle Gene Expression and Cell Fusion.” *Journal of Cellular Physiology* 186 (1) (January): 104–115. doi:10.1002/1097-4652(200101)186:1<104::AID-JCP1015>3.0.CO;2-0.
- Karbowski, Mariusz, Seon-Yong Jeong, and Richard J Youle. 2004. “Endophilin B1 Is Required for the Maintenance of Mitochondrial Morphology.” *The Journal of Cell Biology* 166 (7) (September 27): 1027–1039. doi:10.1083/jcb.200407046.
- Karbowski, Mariusz, Kristi L Norris, Megan M Cleland, Seon-Yong Jeong, and Richard J Youle. 2006. “Role of Bax and Bak in Mitochondrial Morphogenesis.” *Nature* 443 (7112) (October 12): 658–662. doi:10.1038/nature05111.
- Kasahara, Atsuko, Sara Cipolat, Yun Chen, Gerald W Dorn 2nd, and Luca Scorrano. 2013. “Mitochondrial Fusion Directs Cardiomyocyte Differentiation via Calcineurin and Notch Signaling.” *Science (New York, N.Y.)* 342 (6159) (November 8): 734–737. doi:10.1126/science.1241359.
- Keren, Aviad, Yael Tamir, and Eyal Bengal. 2006. “The p38 MAPK Signaling Pathway: A Major Regulator of Skeletal Muscle Development.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 252 (1-2) (June 27): 224–230. doi:10.1016/j.mce.2006.03.017.
- Khurana, Ashwani, and Chinmoy S Dey. 2004. “Involvement of c-Jun N-Terminal Kinase Activities in Skeletal Muscle Differentiation.” *Journal of Muscle*

- Research and Cell Motility* 25 (8): 645–655. doi:10.1007/s10974-004-7099-1.
- Kim, J Y, J-M Hwang, H S Ko, M-W Seong, B-J Park, and S S Park. 2005. "Mitochondrial DNA Content Is Decreased in Autosomal Dominant Optic Atrophy." *Neurology* 64 (6) (March 22): 966–972. doi:10.1212/01.WNL.0000157282.76715.B1.
- Kimberg, D V, and J N Loeb. 1972. "Effects of Cortisone Administration on Rat Liver Mitochondria. Support for the Concept of Mitochondrial Fusion." *The Journal of Cell Biology* 55 (3) (December): 635–643.
- Korobova, Farida, Vinay Ramabhadran, and Henry N Higgs. 2013. "An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2." *Science (New York, N.Y.)* 339 (6118) (January 25): 464–467. doi:10.1126/science.1228360.
- Korshunov, S S, V P Skulachev, and A A Starkov. 1997. "High Protonic Potential Actuates a Mechanism of Production of Reactive Oxygen Species in Mitochondria." *FEBS Letters* 416 (1) (October 13): 15–18.
- Koshiba, Takumi, Scott A Detmer, Jens T Kaiser, Hsiuchen Chen, J Michael McCaffery, and David C Chan. 2004. "Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes." *Science (New York, N.Y.)* 305 (5685) (August 6): 858–862. doi:10.1126/science.1099793.
- Kruse, Shane E, William C Watt, David J Marcinek, Raj P Kapur, Kenneth A Schenkman, and Richard D Palmiter. 2008. "Mice with Mitochondrial Complex I Deficiency Develop a Fatal Encephalomyopathy." *Cell Metabolism* 7 (4) (April): 312–320. doi:10.1016/j.cmet.2008.02.004.
- Kuang, Shihuan, Sophie B Chargé, Patrick Seale, Michael Huh, and Michael A Rudnicki. 2006. "Distinct Roles for Pax7 and Pax3 in Adult Regenerative Myogenesis." *The Journal of Cell Biology* 172 (1) (January 2): 103–113. doi:10.1083/jcb.200508001.
- Langen, Ramon C J, Annemie M W J Schols, Marco C J M Kelders, Jos L J Van Der Velden, Emiel F M Wouters, and Yvonne M W Janssen-Heininger. 2002. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibits Myogenesis through Redox-Dependent and -Independent Pathways." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 283 (3) (September): C714–721. doi:10.1152/ajpcell.00418.2001.
- Lee, Yang-ja, Seon-Yong Jeong, Mariusz Karbowski, Carolyn L Smith, and Richard J Youle. 2004. "Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis." *Molecular*

- Biology of the Cell* 15 (11) (November): 5001–5011.
doi:10.1091/mbc.E04-04-0294.
- Legros, Frédéric, Anne Lombès, Paule Frachon, and Manuel Rojo. 2002. “Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins.” *Molecular Biology of the Cell* 13 (12) (December): 4343–4354.
doi:10.1091/mbc.E02-06-0330.
- Lenaz, Giorgio, and Maria Luisa Genova. 2007. “Kinetics of Integrated Electron Transfer in the Mitochondrial Respiratory Chain: Random Collisions vs. Solid State Electron Channeling.” *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 292 (4) (April): C1221–1239.
doi:10.1152/ajpcell.00263.2006.
- Lewis, M R, and W H Lewis. 1914. “MITOCHONDRIA IN TISSUE CULTURE.” *Science (New York, N.Y.)* 39 (1000) (February 27): 330–333.
doi:10.1126/science.39.1000.330.
- Li, Wei, Mario H. Bengtson, Axel Ulbrich, Akio Matsuda, Venkateshwar A. Reddy, Anthony Orth, Sumit K. Chanda, Serge Batalov, and Claudio A. P. Joazeiro. 2008. “Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 That Regulates the Organelle’s Dynamics and Signaling.” *PLoS ONE* 3 (1) (January 23).
doi:10.1371/journal.pone.0001487.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2198940/>.
- Li, Yi-Ping, Yuling Chen, Andrew S Li, and Michael B Reid. 2003. “Hydrogen Peroxide Stimulates Ubiquitin-Conjugating Activity and Expression of Genes for Specific E2 and E3 Proteins in Skeletal Muscle Myotubes.” *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 285 (4) (October): C806–812. doi:10.1152/ajpcell.00129.2003.
- Li, Zheng, Ken-Ichi Okamoto, Yasunori Hayashi, and Morgan Sheng. 2004. “The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses.” *Cell* 119 (6) (December 17): 873–887. doi:10.1016/j.cell.2004.11.003.
- Lluís, Frederic, Eusebio Perdiguero, Angel R Nebreda, and Pura Muñoz-Cánoves. 2006. “Regulation of Skeletal Muscle Gene Expression by p38 MAP Kinases.” *Trends in Cell Biology* 16 (1) (January): 36–44.
doi:10.1016/j.tcb.2005.11.002.
- Lodi, Raffaele, Caterina Tonon, Maria Lucia Valentino, Stefano Iotti, Valeria Clementi, Emil Malucelli, Piero Barboni, et al. 2004. “Deficit of in Vivo Mitochondrial ATP Production in OPA1-Related Dominant Optic

- Atrophy." *Annals of Neurology* 56 (5) (November): 719–723. doi:10.1002/ana.20278.
- Losón, Oliver C, Zhiyin Song, Hsiuchen Chen, and David C Chan. 2013. "Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 Mediate Drp1 Recruitment in Mitochondrial Fission." *Molecular Biology of the Cell* 24 (5) (March): 659–667. doi:10.1091/mbc.E12-10-0721.
- Lovy, Alenka, Anthony J A Molina, Fernanda M Cerqueira, Kyle Trudeau, and Orian S Shirihai. 2012. "A Faster, High Resolution, mtPA-GFP-Based Mitochondrial Fusion Assay Acquiring Kinetic Data of Multiple Cells in Parallel Using Confocal Microscopy." *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (65): e3991. doi:10.3791/3991.
- Malka, Florence, Olwenn Guillery, Carmen Cifuentes-Diaz, Emmanuelle Guillou, Pascale Belenguer, Anne Lombès, and Manuel Rojo. 2005. "Separate Fusion of Outer and Inner Mitochondrial Membranes." *EMBO Reports* 6 (9) (September): 853–859. doi:10.1038/sj.embor.7400488.
- Mann, Christopher J, Eusebio Perdiguero, Yacine Kharraz, Susana Aguilar, Patrizia Pessina, Antonio L Serrano, and Pura Muñoz-Cánoves. 2011. "Aberrant Repair and Fibrosis Development in Skeletal Muscle." *Skeletal Muscle* 1 (1): 21. doi:10.1186/2044-5040-1-21.
- Margulis, L. 1971. "Symbiosis and Evolution." *Scientific American* 225 (2) (August): 48–57.
- Meeusen, Shelly, J Michael McCaffery, and Jodi Nunnari. 2004. "Mitochondrial Fusion Intermediates Revealed in Vitro." *Science (New York, N.Y.)* 305 (5691) (September 17): 1747–1752. doi:10.1126/science.1100612.
- Melov, S, J A Schneider, B J Day, D Hinerfeld, P Coskun, S S Mirra, J D Crapo, and D C Wallace. 1998. "A Novel Neurological Phenotype in Mice Lacking Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase." *Nature Genetics* 18 (2) (February): 159–163. doi:10.1038/ng0298-159.
- Meriane, M, P Roux, M Primig, P Fort, and C Gauthier-Rouvière. 2000. "Critical Activities of Rac1 and Cdc42Hs in Skeletal Myogenesis: Antagonistic Effects of JNK and p38 Pathways." *Molecular Biology of the Cell* 11 (8) (August): 2513–2528.
- Miyakawa, I, H Aoi, N Sando, and T Kuroiwa. 1984. "Fluorescence Microscopic Studies of Mitochondrial Nucleoids during Meiosis and Sporulation in the Yeast, *Saccharomyces Cerevisiae*." *Journal of Cell Science* 66 (March): 21–38.

- Molina, Anthony J A, and Orian S Shirihai. 2009. "Monitoring Mitochondrial Dynamics with Photoactivatable [corrected] Green Fluorescent Protein." *Methods in Enzymology* 457: 289–304. doi:10.1016/S0076-6879(09)05016-2.
- Nabeshima, Y, K Hanaoka, M Hayasaka, E Esumi, S Li, I Nonaka, and Y Nabeshima. 1993. "Myogenin Gene Disruption Results in Perinatal Lethality because of Severe Muscle Defect." *Nature* 364 (6437) (August 5): 532–535. doi:10.1038/364532a0.
- Niemann, Axel, Marcel Ruegg, Veronica La Padula, Angelo Schenone, and Ueli Suter. 2005. "Ganglioside-Induced Differentiation Associated Protein 1 Is a Regulator of the Mitochondrial Network: New Implications for Charcot-Marie-Tooth Disease." *The Journal of Cell Biology* 170 (7) (September 26): 1067–1078. doi:10.1083/jcb.200507087.
- Olichon, Aurélien, Laurent Baricault, Nicole Gas, Emmanuelle Guillou, Annie Valette, Pascale Belenguer, and Guy Lenaers. 2003. "Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (10) (March 7): 7743–7746. doi:10.1074/jbc.C200677200.
- Olichon, Aurélien, Emmanuelle Guillou, Cécile Delettre, Thomas Landes, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Laurent J Emorine, Valérie Mils, et al. 2006. "Mitochondrial Dynamics and Disease, OPA1." *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 (5-6) (June): 500–509. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.003.
- Olichon, Aurélien, Thomas Landes, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Laurent J Emorine, Valérie Mils, Agnès Guichet, Cécile Delettre, et al. 2007. "Effects of OPA1 Mutations on Mitochondrial Morphology and Apoptosis: Relevance to ADOA Pathogenesis." *Journal of Cellular Physiology* 211 (2) (May): 423–430. doi:10.1002/jcp.20950.
- Otera, Hidenori, Chunxin Wang, Megan M Cleland, Kiyoko Setoguchi, Sadaki Yokota, Richard J Youle, and Katsuyoshi Mihara. 2010. "Mff Is an Essential Factor for Mitochondrial Recruitment of Drp1 during Mitochondrial Fission in Mammalian Cells." *The Journal of Cell Biology* 191 (6) (December 13): 1141–1158. doi:10.1083/jcb.201007152.
- Palmer, Catherine S, Kirstin D Elgass, Robert G Parton, Laura D Osellame, Diana Stojanovski, and Michael T Ryan. 2013. "Adaptor Proteins MiD49 and MiD51 Can Act Independently of Mff and Fis1 in Drp1 Recruitment and Are Specific for Mitochondrial Fission." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (38) (September 20): 27584–27593. doi:10.1074/jbc.M113.479873.

- Palmer, Catherine S, Laura D Osellame, David Laine, Olga S Koutsopoulos, Ann E Frazier, and Michael T Ryan. 2011. "MiD49 and MiD51, New Components of the Mitochondrial Fission Machinery." *EMBO Reports* 12 (6) (June): 565–573. doi:10.1038/embor.2011.54.
- Perdiguero, Eusebio, Vanessa Ruiz-Bonilla, Lionel Gresh, Lijian Hui, Esteban Ballestar, Pedro Sousa-Victor, Bernat Baeza-Raja, et al. 2007. "Genetic Analysis of p38 MAP Kinases in Myogenesis: Fundamental Role of p38alpha in Abrogating Myoblast Proliferation." *The EMBO Journal* 26 (5) (March 7): 1245–1256. doi:10.1038/sj.emboj.7601587.
- Pretegianni, Elena, Alessandra Rufa, Gian Nicola Gallus, Elena Cardaioli, Alessandro Malandrini, and Antonio Federico. 2011. "Spastic Paraplegia in 'Dominant Optic Atrophy plus' Phenotype due to OPA1 Mutation." *Brain: A Journal of Neurology* 134 (Pt 11) (November): e195; author reply e196. doi:10.1093/brain/awr101.
- Quirós, Pedro M, Andrew J Ramsay, David Sala, Erika Fernández-Vizarra, Francisco Rodríguez, Juan R Peinado, Maria Soledad Fernández-García, et al. 2012. "Loss of Mitochondrial Protease OMA1 Alters Processing of the GTPase OPA1 and Causes Obesity and Defective Thermogenesis in Mice." *The EMBO Journal* 31 (9) (May 2): 2117–2133. doi:10.1038/emboj.2012.70.
- Ranieri, Michela, Roberto Del Bo, Andreina Bordoni, Dario Ronchi, Irene Colombo, Giulietta Riboldi, Alessandra Cosi, et al. 2012. "Optic Atrophy plus Phenotype due to Mutations in the OPA1 Gene: Two More Italian Families." *Journal of the Neurological Sciences* 315 (1-2) (April 15): 146–149. doi:10.1016/j.jns.2011.12.002.
- Rawls, A, M R Valdez, W Zhang, J Richardson, W H Klein, and E N Olson. 1998. "Overlapping Functions of the Myogenic bHLH Genes MRF4 and MyoD Revealed in Double Mutant Mice." *Development (Cambridge, England)* 125 (13) (July): 2349–2358.
- Relaix, Frédéric, Didier Montarras, Stéphane Zaffran, Barbara Gayraud-Morel, Didier Rocancourt, Shahragim Tajbakhsh, Ahmed Mansouri, Ana Cumano, and Margaret Buckingham. 2006. "Pax3 and Pax7 Have Distinct and Overlapping Functions in Adult Muscle Progenitor Cells." *The Journal of Cell Biology* 172 (1) (January 2): 91–102. doi:10.1083/jcb.200508044.
- Rizzuto, R, P Bernardi, and T Pozzan. 2000. "Mitochondria as All-Round Players of the Calcium Game." *The Journal of Physiology* 529 Pt 1 (November 15): 37–47.

- Rudnicki, M A, T Braun, S Hinuma, and R Jaenisch. 1992. "Inactivation of MyoD in Mice Leads to up-Regulation of the Myogenic HLH Gene Myf-5 and Results in Apparently Normal Muscle Development." *Cell* 71 (3) (October 30): 383–390.
- Rudnicki, M A, P N Schnegelsberg, R H Stead, T Braun, H H Arnold, and R Jaenisch. 1993. "MyoD or Myf-5 Is Required for the Formation of Skeletal Muscle." *Cell* 75 (7) (December 31): 1351–1359.
- Rutter, G A, and R Rizzuto. 2000. "Regulation of Mitochondrial Metabolism by ER Ca²⁺ Release: An Intimate Connection." *Trends in Biochemical Sciences* 25 (5) (May): 215–221.
- Sabourin, L A, A Girgis-Gabardo, P Seale, A Asakura, and M A Rudnicki. 1999. "Reduced Differentiation Potential of Primary MyoD^{-/-} Myogenic Cells Derived from Adult Skeletal Muscle." *The Journal of Cell Biology* 144 (4) (February 22): 631–643.
- Santel, Ansgar, Stephan Frank, Brigitte Gaume, Michael Herrler, Richard J Youle, and Margaret T Fuller. 2003. "Mitofusin-1 Protein Is a Generally Expressed Mediator of Mitochondrial Fusion in Mammalian Cells." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 13) (July 1): 2763–2774. doi:10.1242/jcs.00479.
- Saraste, M. 1999. "Oxidative Phosphorylation at the Fin de Siècle." *Science (New York, N.Y.)* 283 (5407) (March 5): 1488–1493.
- Sazanov, L A, S Y Peak-Chew, I M Fearnley, and J E Walker. 2000. "Resolution of the Membrane Domain of Bovine Complex I into Subcomplexes: Implications for the Structural Organization of the Enzyme." *Biochemistry* 39 (24) (June 20): 7229–7235.
- Schägger, H, and K Pfeiffer. 2000. "Supercomplexes in the Respiratory Chains of Yeast and Mammalian Mitochondria." *The EMBO Journal* 19 (8) (April 17): 1777–1783. doi:10.1093/emboj/19.8.1777.
- Scheffler, I E. 2001. "A Century of Mitochondrial Research: Achievements and Perspectives." *Mitochondrion* 1 (1) (June): 3–31.
- Schneeberger, Marc, Marcelo O Dietrich, David Sebastián, Mónica Imbernón, Carlos Castaño, Ainhoa Garcia, Yaiza Esteban, et al. 2013. "Mitofusin 2 in POMC Neurons Connects ER Stress with Leptin Resistance and Energy Imbalance." *Cell* 155 (1) (September 26): 172–187. doi:10.1016/j.cell.2013.09.003.
- Schreck, R, P Rieber, and P A Baeuerle. 1991. "Reactive Oxygen Intermediates as Apparently Widely Used Messengers in the Activation of the NF-

- Kappa B Transcription Factor and HIV-1." *The EMBO Journal* 10 (8) (August): 2247–2258.
- Sebastián, David, María Isabel Hernández-Alvarez, Jessica Segalés, Eleonora Sorianello, Juan Pablo Muñoz, David Sala, Aurélie Waget, et al. 2012. "Mitofusin 2 (Mfn2) Links Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Function with Insulin Signaling and Is Essential for Normal Glucose Homeostasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (14) (April 3): 5523–5528. doi:10.1073/pnas.1108220109.
- Segalés, Jessica, José C Paz, María Isabel Hernández-Alvarez, David Sala, Juan Pablo Muñoz, Eduard Noguera, Sara Pich, Manuel Palacín, José Antonio Enríquez, and Antonio Zorzano. 2013. "A Form of Mitofusin 2 (Mfn2) Lacking the Transmembrane Domains and the COOH-Terminal End Stimulates Metabolism in Muscle and Liver Cells." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 305 (10) (November): E1208–1221. doi:10.1152/ajpendo.00546.2012.
- Smirnova, E, L Griparic, D L Shurland, and A M van der Blik. 2001. "Dynamain-Related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells." *Molecular Biology of the Cell* 12 (8) (August): 2245–2256.
- Smirnova, E, D L Shurland, S N Ryazantsev, and A M van der Blik. 1998. "A Human Dynamain-Related Protein Controls the Distribution of Mitochondria." *The Journal of Cell Biology* 143 (2) (October 19): 351–358.
- Song, Zhiyin, Hsiuchen Chen, Maja Fiket, Christiane Alexander, and David C Chan. 2007. "OPA1 Processing Controls Mitochondrial Fusion and Is Regulated by mRNA Splicing, Membrane Potential, and Yme1L." *The Journal of Cell Biology* 178 (5) (August 27): 749–755. doi:10.1083/jcb.200704110.
- Song, Zhiyin, Mariam Ghochani, J Michael McCaffery, Terrence G Frey, and David C Chan. 2009. "Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion." *Molecular Biology of the Cell* 20 (15) (August): 3525–3532. doi:10.1091/mbc.E09-03-0252.
- Stock, D, A G Leslie, and J E Walker. 1999. "Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase." *Science (New York, N.Y.)* 286 (5445) (November 26): 1700–1705.

- Suen, Der-Fen, Kristi L Norris, and Richard J Youle. 2008. "Mitochondrial Dynamics and Apoptosis." *Genes & Development* 22 (12) (June 15): 1577–1590. doi:10.1101/gad.1658508.
- Takada, Yasunari, Asok Mukhopadhyay, Gopal C Kundu, Ganapati H Mahabeleshwar, Sujay Singh, and Bharat B Aggarwal. 2003. "Hydrogen Peroxide Activates NF-Kappa B through Tyrosine Phosphorylation of I Kappa B Alpha and Serine Phosphorylation of p65: Evidence for the Involvement of I Kappa B Alpha Kinase and Syk Protein-Tyrosine Kinase." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (26) (June 27): 24233–24241. doi:10.1074/jbc.M212389200.
- Tang, Sha, Phung Khanh Le, Stephanie Tse, Douglas C Wallace, and Taosheng Huang. 2009. "Heterozygous Mutation of Opa1 in Drosophila Shortens Lifespan Mediated through Increased Reactive Oxygen Species Production." *PLoS One* 4 (2): e4492. doi:10.1371/journal.pone.0004492.
- Thomas, D Y, and D Wilkie. 1968. "Recombination of Mitochondrial Drug-Resistance Factors in Saccharomyces Cerevisiae." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 30 (4) (February 26): 368–372.
- Tondera, Daniel, Frank Czauderna, Katharina Paulick, Rolf Schwarzer, Jörg Kaufmann, and Ansgar Santel. 2005. "The Mitochondrial Protein MTP18 Contributes to Mitochondrial Fission in Mammalian Cells." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 14) (July 15): 3049–3059. doi:10.1242/jcs.02415.
- Tsukihara, T, H Aoyama, E Yamashita, T Tomizaki, H Yamaguchi, K Shinzawa-Itoh, R Nakashima, R Yaono, and S Yoshikawa. 1996. "The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å." *Science (New York, N.Y.)* 272 (5265) (May 24): 1136–1144.
- Twig, Gilad, Alvaro Elorza, Anthony J A Molina, Hibo Mohamed, Jakob D Wikstrom, Gil Walzer, Linsey Stiles, et al. 2008. "Fission and Selective Fusion Govern Mitochondrial Segregation and Elimination by Autophagy." *The EMBO Journal* 27 (2) (January 23): 433–446. doi:10.1038/sj.emboj.7601963.
- Twig, Gilad, Solomon A Graf, Jakob D Wikstrom, Hibo Mohamed, Sarah E Haigh, Alvaro Elorza, Motti Deutsch, Naomi Zurgil, Nicole Reynolds, and Orian S Shirihai. 2006. "Tagging and Tracking Individual Networks within a Complex Mitochondrial Web with Photoactivatable GFP." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 291 (1) (July): C176–184. doi:10.1152/ajpcell.00348.2005.
- Twig, Gilad, Brigham Hyde, and Orian S. Shirihai. 2008. "Mitochondrial Fusion, Fission and Autophagy as a Quality Control Axis: The Bioenergetic

- View." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777 (9): 1092–1097. doi:10.1016/j.bbabi.2008.05.001.
- Ustanina, Svetlana, Jaime Carvajal, Peter Rigby, and Thomas Braun. 2007. "The Myogenic Factor Myf5 Supports Efficient Skeletal Muscle Regeneration by Enabling Transient Myoblast Amplification." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (8) (August): 2006–2016. doi:10.1634/stemcells.2006-0736.
- Wakabayashi, Junko, Zhongyan Zhang, Nobunao Wakabayashi, Yasushi Tamura, Masahiro Fukaya, Thomas W Kensler, Miho Iijima, and Hiromi Sesaki. 2009. "The Dynamin-Related GTPase Drp1 Is Required for Embryonic and Brain Development in Mice." *The Journal of Cell Biology* 186 (6) (September 21): 805–816. doi:10.1083/jcb.200903065.
- Wang, X. 2001. "The Expanding Role of Mitochondria in Apoptosis." *Genes & Development* 15 (22) (November 15): 2922–2933.
- Yaffe, D, and O Saxel. 1977. "Serial Passaging and Differentiation of Myogenic Cells Isolated from Dystrophic Mouse Muscle." *Nature* 270 (5639) (December 22): 725–727.
- Yoon, Yisang, Eugene W Krueger, Barbara J Oswald, and Mark A McNiven. 2003. "The Mitochondrial Protein hFis1 Regulates Mitochondrial Fission in Mammalian Cells through an Interaction with the Dynamin-like Protein DLP1." *Molecular and Cellular Biology* 23 (15) (August): 5409–5420.
- Zanna, Claudia, Anna Ghelli, Anna Maria Porcelli, Mariusz Karbowski, Richard J. Youle, Simone Schimpf, Bernd Wissinger, et al. 2008. "OPA1 Mutations Associated with Dominant Optic Atrophy Impair Oxidative Phosphorylation and Mitochondrial Fusion." *Brain* 131 (2) (February 1): 352–367. doi:10.1093/brain/awm335.
- Zhang, W, R R Behringer, and E N Olson. 1995. "Inactivation of the Myogenic bHLH Gene MRF4 Results in up-Regulation of Myogenin and Rib Anomalies." *Genes & Development* 9 (11) (June 1): 1388–1399.
- Zhou, L Z, A P Johnson, and T A Rando. 2001. "NF Kappa B and AP-1 Mediate Transcriptional Responses to Oxidative Stress in Skeletal Muscle Cells." *Free Radical Biology & Medicine* 31 (11) (December 1): 1405–1416.
- Züchner, Stephan, Irina V Mersyanova, Maria Muglia, Nisrine Bissar-Tadmouri, Julie Rochelle, Elena L Dadali, Mario Zappia, et al. 2004. "Mutations in the Mitochondrial GTPase Mitofusin 2 Cause Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A." *Nature Genetics* 36 (5) (May): 449–451. doi:10.1038/ng1341.

ANNEX

9 ANNEX

9.1 Llista de miRNAs

Encebador	Seqüència	miRNA final
Opa1_1834_top	TGCTGAAAGCAGTCTGACACAGCAAGTTTTGGCCACTGACTGACCTTGCTGTCAGACTGCTTT	miR1 Opa1
Opa1_1834_bottom	CCTGAAAGCAGTCTGACAGCAAGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTTGCTGTCAGACTGCTTTC	
Opa1_2182_top	TGCTGTTTATTAGGAAGCTGCTTGTCTGTTTTGGCCACTGACTGACGACAAGCATTCTTAATAAAA	
Opa1_2182_bottom	CCTGTTTATTAGGAATGCTTGTCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACGACAAGCAGTCTCTAATAAAC	miR2 Opa1
Opa1_1462_top	TGCTGAAGTCTGTAACAATACTGCCTGTTTTGGCCACTGACTGACGCGCAGTAGTTACAGACTT	
Opa1_1462_bottom	CCTGAAGTCTGTAACACTCTGCCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCGCAGTAGTTACAGACTTC	
Opa1_2549_top	TGCTGTTTCGTTGTGAACACACTGCTGTTTTGGCCACTGACTGACAGCAGTGTTCACAACGAAA	miR1 Mfn1
Opa1_2549_bottom	CCTGTTTCGTTGTGAACACTGCTGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCGCAGTAGTTTCACAACGAAA	
Mfn1_778_top	TGCTGTTATCAATCCAGATATCCAGCGTTTTGGCCACTGACTGACGCTGGATATGGATTGATAA	
Mfn1_778_bottom	CCTGTTATCAATCCATATCCAGCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCTGGATATCTGGATTGATAAC	miR2 Mfn1
Mfn1_1661_top	TGCTGTATACCAGCTGGAAGTAGTGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCACTACTCAGCTGGTATA	
Mfn1_1661_bottom	CCTGTATACCAGCTGAGTAGTGGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCCACTACTCCAGCTGGTATAC	
Mfn1_926_top	TGCTGAGCAGAAGCATCCCAACGGTTGTTTTGGCCACTGACTGACAACCGTTGATGCTTCTGCTC	miR1 Mfn1
Mfn1_926_bottom	CCTGAGCAGAAGCATCAACGGTTGTCAGTCAGTGGCCAAAACCAACCGTTGGGATGCTTCTGCTC	
Mfn1_1560_top	TGCTGTCCCATGCCATCTTCTATGTGTTTTGGCCACTGACTGACACATAGAATGGCATGGGAA	
Mfn1_1560_bottom	CCTGTCCCATGCCATCTTCTATGTGTCAGTCAGTGGCCAAAACACATAGAAGATGGCATGGGAA	miRctrl
miRNA control	TGCTGAAATGTAAGTCTGCCTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGCTCTCCACGAGTACATTT	

*El número marca la posició d'inici en el mRNA.

9.2 Llista d'encebadors

9.2.1 Sybr Green

Encebador	Fwd/Rv	Seqüència
SdhA	Fwd	TACTACAGCCCAAGTCT
	Rv	TGGACCCATCTTCTATGC
Cox2	Fwd	CTACAAGACGCCACAT
	Rv	GAGAGGGGAGAGCAAT
MyoD	Fwd	AGGCCGTGGCAGCGA
	Rv	GCTGTAATCCATCATGCCATCA
Miogenina	Fwd	CAACCAGGAGGAGCGCATCTCCG
	Rv	AGGCGCTGTGGGAGTTGCATTTCACT
Caveolina 3	Fwd	AGCACACGGATCTGGAAGCT
	Rv	CTCCGCAATCACGTCTTCAA
ARP	Fwd	AAGCGCTCTGGCATTGTCT
	Rv	CCGCAGGGGAGCAGTGGT

9.2.2 TaqMan

Gen	Referència	Gen	Referència
Opa1	Mm00453879_m1	ZEB	Mm00495564_m1
Mfn1	Mm00612599_m1	COUP-TFII	Mm00772789_m1
Id	Mm00775963_g1	Casq1	Mm00486725_m1
Twist	Mm00442036_m1	Chrne	Mm00437411_m1
MyoR	Mm00447887_m1	Mybpc2	Mm00525419_m1
N-Cor	Mm01198152_g1	Myh4	Mm01332518_m1
I-mfa	Mm00521983_m1	Serca1	Mm01275320_m1
c-jun	Mm00495062_s1	Serca2	Mm01201431_m1
cdk4	Mm00726334_s1	Tnnt3	Mm01268863_m1

9.2.3 Seqüenciació

Encebador	Fwd/Rv	Seqüència
M13	Fwd	GTAAAACGACGGCCAG
	Rv	CAGGAAACAGCTATGAC
CMV	Fwd	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
V5	Rv	ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT
EmGFP	Fwd	GGCATGGACGAGCTGTACAA

9.2.4 Cribatge i genotipació del ratolí KO per Opa1 específic de múscul esquelètic

Encebador	Fwd/Rv	Seqüència
HF2	Fwd	GGGTAGAATCAGAGACAGCC
HR2	Rv	TTCTGTGCACACTGGTGTCC
5'U LAR3	Rv	CACAACGGGTTCTTCTGTAGTCC
GF4	Fwd	CAGTGCACTGTATACATCTCCATGC
GF5	Fwd	TGGGCTCCCCTGAGGTCACC
GR3	Rv	CAATTCTAAGTCTCTTAAGTGTGCAGAGC
GR4	Rv	CTTGAGTAAGTCAAGCACAACCTGATC
KO cass 5' diag rev3	Rv	GGCCACCCAACCTGACCTTGGG
KO cass 3' diag fwd2	Fwd	TCATGCTGGAGTTCTTCGCC
3'U PNF	Fwd	ATCCGGGGGTACCGCGTGCAG

9.3 Llista d'anticossos

Proteïna reconeguda	Procedència	Espècie d'origen	Dilució
Opa1	BD Transduction	Ratolí	1/1000
Mfn1	Cedit pel Dr Manuel Rojo	Conill	1/200
Mfn2	Abcam	Ratolí	1/500
Drp1	BD Transduction	Ratolí	1/1000
Fis1	Cedit pel Dr Yisang Yoon	Conill	1/1000
α -tub	Sigma	Ratolí	1/8000
Ndufa (complex I)	Molecular Probes	Ratolí	1/1000
SdhA (complex II)	Molecular Probes	Ratolí	1/1000
Subunit core 1 (complex III)	Molecular Probes	Ratolí	1/1000
Uqcrc2 (complex III)	Molecular Probes	Ratolí	1/1000
Cox 4 (complex IV)	Molecular Probes	Ratolí	1/1000
Atp5a1 (complex V)	Molecular Probes	Ratolí	1/1000
MyoD	BD Transduction	Ratolí	1/500
Miogenina	BD Transduction	Ratolí	1/1000
Cav3	BD Transduction	Ratolí	1/1000
MHC (MF20)	Developmental Studies Hybridoma Bank	Ratolí	1/50
pp38	Cell signaling	Ratolí	1/1000
p38 _{TOTAL}	Cell signaling	Conill	1/1000
pErk	Cell signaling	Conill	1/1000
Erk _{TOTAL}	Cell signaling	Ratolí	1/1000
pJNK	Cell signaling	Ratolí	1/1000
JNK _{TOTAL}	Cell signaling	Conill	1/1000
I κ B- α	Santa Cruz	Ratolí	1/500
I κ B- β	Santa Cruz	Conill	1/500

9.4 Publicacions

- 1) Muñoz JP, Ivanova S, Sánchez-Wandelmer J, Martínez-Cristóbal P, **Noguera E**, Sancho A, Díaz-Ramos A, Hernández-Alvarez MI, Sebastián D, Mauvezin C, Palacín M, Zorzano A. **Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK**. EMBO J (2013).
- 2) Parra V, Verdejo HE, Iglewski M, Campo AD, Troncoso R, Jones D, Zhu Y, Kuzmicic J, Pennanen C, Lopez-Crisosto C, Jaña F, Ferreira J, **Noguera E**,

- Chiong M, Bernlohr DA, Klip A, Hill JA, Rothermel BA, Abel ED, Zorzano A, Lavandero S. **Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via de Akt-mTOR-NFkB-Opa-1 signaling pathway.** Diabetes (2013).
- 3) Segales J, Paz JC, Hernández-Alvarez MI, Sala D, Muñoz JP, **Noguera E**, Pich S, Palacin M, Enriquez JA, Zorzano A. **A form of Mitofusin 2 (Mfn2) lacking the transmembrane domains and the COOH-terminal end stimulates metabolism in muscle and liver cells.** Am J Physiol Endocrinol Metab (2013).
- 4) Angels Díaz-Ramos*, **Eduard Noguera***, Xavier Duran, Juan Pablo Muñoz, Montserrat Romero, Natàlia Plana, David Sebastián, Jordi Seco, Evarist Planet, Susan R. Doctrow, Javier González, Miquel Borràs, Marc Liesa, Manuel Palacín, Joan Vendrell, Orián Shirihai, Antonio Zorzano. **Muscle Opa1 ablation triggers non-cell-autonomous actions on growth and inflammation, and reduces lifespan.** (*AD-R and EN equally contributed to the manuscript). (In preparation).