



Instituto de Biomedicina de Valencia



**FISIOPATOLOGÍA CELULAR DEL DÉFICIT DE GDAP1,
RELACIONADO CON LA ENFERMEDAD DE
CHARCOT-MARIE-TOOTH**

Memoria presentada por

David Pla Martín

para optar al grado de Doctor en Biología

Valencia, 2012

D. Francesc Palau Martínez, Doctor en Medicina y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que Don David Pla Martín, licenciado en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Fisiopatología celular del déficit de GDAP1, relacionado con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth”.

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctor.

En Valencia, a 15 de Mayo de 2012

Prof. Francesc Palau Martínez

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento de tener que escribir estas líneas y quizás se presenta como lo más complicado de todo. En primer lugar darle las gracias a Paco por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por su apoyo, ideas y consejos.

Quisiera darle las gracias a todos mis compañeros del laboratorio que, en mayor o menor medida, han contribuido a la realización de este trabajo. A todos los que ya se han ido y a todos los que aún esta, gracias.

No me puedo olvidar de la gente del Departamento de Genética de la Universidad de Valencia y a todos mis amigos y compañeros del Máster. Con ellos empecé en este mundo y no podía haber empezado mejor.

Además, agradecer a toda la gente del laboratorio de señalización mitocondrial por calcio en el CBMSO de Madrid, por todo el apoyo durante el tiempo que estuve trabajando con ellos y por todo el trabajo que han realizado después. Ellos han conseguido darle un gran valor a este trabajo.

Finalmente a mi familia, por estar ahí, por el apoyo mostrado aún sin entender nada. Y sobretodo a mi madre, sin su apoyo y su insistencia esto no habría sido posible.

A todos, GRACIAS.

INTRODUCCIÓN

1. Neuropatías periféricas hereditarias.....	15
2. El Sistema Nervioso.....	17
3. La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.....	20
i) Aspectos Históricos.....	21
ii) Clínica de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.....	23
iii) Clasificación de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.....	26
4. <i>GDAP1</i> , el gen que produce CMT4A, AR-CMT2K, CMT2K y RI-CMTA.....	29
5. La mitocondria en los procesos de neurodegeneración.....	34
i) Dinámica mitocondrial.....	35
ii) Transporte de mitocondrias.....	37
6. Homeostasis de calcio.....	38
7. Diferenciación neural mediada por neurotrofinas.....	41
8. Estrés Oxidativo.....	43

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material Biológico.....	47
i) Bacterias.....	47
ii) Levaduras.....	48
iii) Células de mamífero en cultivo.....	49
2. Ensayo de doble híbrido.....	50
i) Vectores.....	50
ii) Transformación de levaduras para el ensayo de doble híbrido.....	50
iii) Ensayo de β -galactosidasa.....	52
iv) Extracción de los plásmidos.....	53

3. Modelo de sobreexpresión. Confirmación de las interacciones.....	54
i) Vectores.....	54
ii) Transfección de células de mamífero HeLa.....	56
iii) Coimmunoprecipitación (coIP).....	57
4. Geles Nativos.....	58
5. Fraccionamiento subcelular y centrifugación diferencial.....	59
6. Modelo de silenciamiento por RNAi.....	60
i) Transfección de células SH-SY5Y.....	61
7. Microscopía de fluorescencia.....	62
i) Experimentos de colocalización.....	62
ii) Morfología mitocondrial.....	63
iii) Parámetros morfológicos mitocondriales. Interconectividad e Índice de elongación.....	63
iv) Movimiento mitocondrial.....	64
v) Colocalización retículo endoplásmico-mitocondria.....	65
8. Microscopía electrónica.....	66
9. Medición de calcio.....	67
i) Medidas de calcio citosólico.....	67
ii) Capacidad de carga en células permeabilizadas.....	68
10. Diferenciación de células SH-SY5Y.....	68
11. Estrés Oxidativo y Apoptosis.....	69

RESULTADOS

CAPITULO I. BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE GDAP1

1. GDAP1 se localiza formando dímeros en la membrana mitocondrial externa regulando la morfología y el movimiento mitocondrial.....	73
2. GDAP1 interacciona principalmente con proteínas relacionadas con el citoesqueleto y proteínas de membrana.....	79

3. GDAP1 condiciona la colocación entre la mitocondria y el retículo endoplásmico.....88

4. El efecto de mutaciones patológicas de GDAP1 es variable y se relaciona en parte con el patrón mendeliano de herencia.....98

CAPITULO II. ANÁLISIS DE CAMBIOS FUNCIONALES CELULARES EN EL DÉFICIT DE GDAP1

1. La diferenciación neuronal de células SH-SY5Y deficientes en GDAP1 se relaciona con la falta de proteínas relacionadas con el citoesqueleto debido a una desregulación de la ruta AKT.....107

2. El silenciamiento de *GDAP1* condiciona la susceptibilidad al estrés de retículo.....111

DISCUSIÓN.....121

1. GDAP1 como una molécula “adaptadora” de la mitocondria al citoesqueleto y “moduladora” de la homeostasis de calcio.....125

2. Fisiopatología asociada a la reducción en los niveles de GDAP1.....134

CONCLUSIONES.....141

BIBLIOGRAFÍA.....145

ANEXOS

Anexo I – Oligonucleótidos.....161

Anexo II – Kernel para deconvolución.....163

Anexo III – Anticuerpos.....164

INTRODUCCIÓN

1 Neuropatías Periféricas Hereditarias

Las neuropatías periféricas hereditarias representan uno de los grupos de enfermedades genéticas mendelianas de mayor prevalencia en la población, con gran heterogeneidad clínica y genética. En este tipo de enfermedades se produce una degeneración progresiva de los nervios periféricos, lo que conlleva una amplia gama de síntomas dependiendo de los nervios afectados.

En función de la fisiología de los nervios involucrados, las neuropatías periféricas hereditarias se clasifican en neuropatías sensitivo-motoras hereditarias (NSMH), neuropatías motoras hereditarias (NMH), neuropatías sensitivas hereditarias (NSH) y neuropatías sensitivas y autosómicas hereditarias (NSAH).

Las formas más comunes son aquellas que afectan tanto a los nervios sensitivos como a los motores (NSMH) con una prevalencia estimada de alrededor de 28 individuos por cada 100.000 en población del norte de España¹. En estas neuropatías, se pueden distinguir cuatro tipos de formas clínicas²: la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), el síndrome de Déjérine-Sottas hereditario (DS), la neuropatía hipomielinizante congénita (NHC) y la neuropatía con susceptibilidad a la parálisis por presión (NHPP). De estas, la forma más común es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, con una prevalencia de 17-40 individuos de cada 100.000 habitantes en distintas poblaciones^{1,3,4}.

La NHC es producida por defectos en la mielinización de los nervios durante el desarrollo en los que se observan también velocidades de

conducción nerviosa (VCN) menores a 10 m/s que cursan con hipotonía infantil, dismielinización, debilidad distal y arreflexia relacionadas con la baja VCN. De transmisión tanto autosómica dominante como recesiva, la clínica corresponde en el nacimiento del individuo con hipotonía, llanto débil y debilidad para respirar y tragar. En las biopsias de nervio sural se encuentra ausencia virtual de vainas de mielina.

La NHPP es una enfermedad de transmisión autosómica dominante producida por deleción en el gen PMP22, conlleva otro tipo de síntomas en los que las VCN también pueden estar disminuidas, episodios de percepción disminuida y paresia. Los enfermos de NHPP presentan mononeuropatía, mononeuropatía múltiple o plexopatía braquial, frecuentemente precipitada por un trauma leve. Los nervios más alterados son mediano, cubital, radial y peroneo. La biopsia de nervio muestra una neuropatía tomaculosa con cambios de desmielinización con remielinización y formaciones en bulbo de cebolla.

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth desmielinizante y el síndrome de Déjérine-Sottas poseen ambas una clínica similar con afectación de los nervios sensitivos y motores y reducción en la velocidad de conducción nerviosa (VCN), con pérdida del número de axones y reducción del potencial de acción a lo largo de la evolución de la historia natural en los pacientes. El síndrome de DS comprende las formas más graves con VCN menores a 10 m/s y problemas en la adquisición de habilidades motoras. La forma axonal de CMT no se asocia a VCN reducida aunque hay una alteración primaria del potencial de acción. La enfermedad puede presentarse a cualquier edad produciendo debilidad de la

musculatura distal. Se puede asociar también con afectación de los nervios craneales, espasmos de los músculos de los ojos, pie cavo y cifoescoliosis.

2 El sistema nervioso

El sistema nervioso (SN) es un conjunto de tejidos de origen ectodérmico cuya función principal es la de captar y procesar rápidamente las señales de modo que controla y coordina los demás órganos para interactuar correctamente con el medio ambiente.

El SN se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está formado por encéfalo y médula espinal y es donde se integra y relaciona la información procedente del medio. El SNC está conectado con los receptores sensitivos, los músculos y las glándulas de las zonas periféricas a través del SNP, formado por los nervios craneales y los raquídeos. En el SNP encontramos neuronas sensitivas aferentes, que conducen los impulsos nerviosos desde los receptores sensitivos hasta el SNC, y las neuronas motoras o eferentes que conducen los impulsos nerviosos desde el SNC hacia los músculos (Fig. 1a).

El SNP comprende el conjunto de nervios y ganglios de la raíz dorsal que envían información desde y hacia el sistema nervioso central. El SNP puede separarse en somático y autónomo. El somático conduce información desde los receptores sensoriales hacia el SNC y por axones motores hacia los músculos esqueléticos. El SN autónomo es la parte que

regula las acciones involuntarias llevando la información desde el SNC hacia la musculatura lisa, cardíaca y glándulas.

El nervio periférico es un conjunto de fibras formadas por axones de neuronas motoras y sensitivas, parte de ellas rodeadas por mielina formada por las células de Schwann (Fig. 1b). La mielinización de los axones se produce durante el desarrollo cuando las células inmaduras migran desde la cresta neural y la médula espinal y, en función de los contactos que produzcan, se diferencian en células de Schwann mielinizantes, en los axones largos y, células de Schwann no mielinizantes, en el caso de los axones cortos. La célula de Schwann se encarga de dar soporte a los axones.

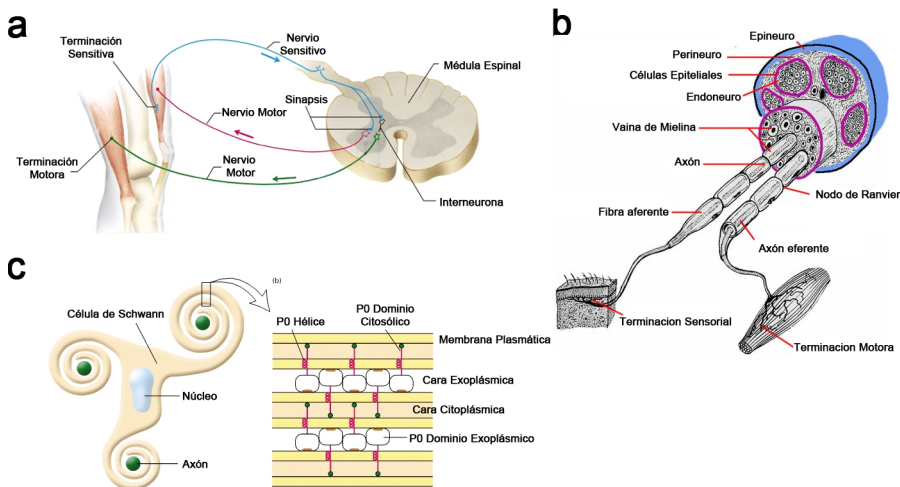


Figura 1. Estructura del Sistema Nervioso Periférico. (a) Esquema de los componentes del SNP. (b) Esquema de una fibra nerviosa del SNP. (c) Empaquetamiento de los axones por bandas de mielina por las células de Schwann. Adaptado de *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*.

La mielina es una vaina aislante formada por esfingolípidos y proteínas conformada por las células de Schwann que envuelven los axones, encargándose de aislarlos de las fibras nerviosas, aumentando la velocidad de conducción y permitiendo el impulso nervioso. Estas moléculas dirigen sus regiones apolares hidrófobas hacia el interior y sus grupos cargados hidrofílicos hacia el exterior. La vaina de mielina envuelve el axón excepto en los nodos de Ranvier permitiendo, de este modo, la conducción saltatoria de nodo a nodo e incrementando la velocidad de transmisión del impulso.

La mielina presenta una gran complejidad estructural. Se pueden diferenciar dos zonas, una compacta y otra no compacta. La zona compacta esta formada principalmente por tres tipos de proteínas: la proteína P_0 , la proteína PMP22 (proteína mielínica periférica 22) y la proteína MBP (proteína básica de mielina) (Fig. 1c).

La proteína P_0 constituye más de la mitad de las proteínas de mielina. Es una proteína de unos 30 KDa que se ancla a la membrana externa y permite el empaquetamiento de las diferentes capas de mielina. La MBP comprende entre el 5-20% de las proteínas con una función claramente estructural. La proteína PMP22 comprende menos del 5% de las proteínas de mielina cuya función es el ensamblaje y mantenimiento de las vainas de mielina.

La zona no compacta (nodo de Ranvier e incisura de Schmidt-Lentermann), se caracteriza por espacios entre 12-14 nm entre las superficies extracelulares y la presencia de citoplasma en la cara interna

de estas membranas. Las proteínas presentes en esta zona están encargadas de la interacción de las células de Schwann. Estas zonas se encuentran enriquecidas por proteínas MAG (glicoproteínas asociadas a mielina), conexina 32 y otras proteínas encargadas de la interacción entre células.

Gran parte de las neuropatías periféricas están causadas por mutaciones en los genes implicados en los procesos de mielinización, establecimiento de los nodos de Ranvier y diferenciación de células de Schwann.

3 La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es uno de los trastornos neurológicos hereditarios más comunes que afecta aproximadamente a 1 de cada 2.500 – 5000 habitantes. La enfermedad recibe el nombre de los tres médicos que la identificaron por primera vez en 1886, Jean-Marie Charcot y Pierre Marie en París, y Howard Henry Tooth en Cambridge, Inglaterra. La enfermedad CMT, también conocida como neuropatía hereditaria motora y sensitiva o atrofia muscular peroneal, abarca un grupo de trastornos que afectan tanto a los nervios periféricos sensitivos como motores.

Alrededor del 70% de los pacientes pueden recibir un diagnóstico molecular preciso ya que se conocen más de 40 genes implicados en CMT⁵. Sin embargo, a día de hoy, aun existen familias sin un diagnóstico molecular claro dependiendo el diagnóstico de los estudios electrofisiológicos y/o histopatológicos de la biopsia de nervio o de terminaciones nerviosas cutáneas.

i) Aspectos históricos

Los primeros indicios de la enfermedad CMT se publicaron en Francia bajo el título de *Une forme particulière d'atrophie musculaire progressive* en la revista *Revue de Médecine*, en donde Charcot y Marie dieron a conocer las características de lo que ellos llamaron Atrofia Muscular Peroneal. El mismo año, unos meses más tarde, en Inglaterra, Tooth publicó la descripción de una neuropatía a la que el llamó *Progressive peroneal muscular atrophy*. La enfermedad que hoy conocemos como Charcot-Marie-Tooth tenía un carácter familiar con inicio temprano pero de progresión lenta que se caracteriza por debilidad muscular y atrofia peroneal.

En 1893, Déjérine y Sottas describen una neuropatía familiar en dos hermanos en los que la hipertrofia de los nervios producían importantes atrofias distales y alteraciones sensitivas de la coordinación⁶. Ya en el siglo XX, Roussy y Lévy publicaron las características clínicas de una familia con un síndrome parecido al de CMT pero sin atrofia de los músculos, con sensibilidad normal y temblor en alguno de los pacientes⁷. Posteriormente se fueron realizando avances, no libres de confusiones debido a la variedad en la sintomatología, como las diferenciación según los patrones de herencia (dominante o recesiva) y la fisiopatología de la enfermedad relacionada con la afectación a los nervios (desmielinizante o axonal).

No fue hasta los años 60 del siglo XX cuando Dyck y Lambert separaron a los pacientes en dos grupos en función de la velocidad de conducción nerviosa y la biopsia del nervio sural. Así, el tipo 1 o neuropatía

hereditaria motora y sensitiva tipo I (NSMH I) se caracterizaba por desmielinización segmentaria, lo que producía un descenso en las velocidades de conducción del nervio y algunos casos de hipertrofia, con transmisión genética de tipo dominante. Por otro lado, en la neuropatía hereditaria motora y sensitiva Tipo II (NSMH II), la velocidad de conducción era normal y las biopsias mostraban procesos de degeneración axonal y regeneración con herencia también dominante. Los casos más agresivos se denominaron NSMH III o enfermedad de Déjérine-Sottas^{8,9} y correspondía a las formas recesivas. La controversia continuó en años posteriores ya que otros autores no encontraban una distribución tan clara en las VCN y las biopsias, e incluso se encontraron pacientes con VCN intermedias¹⁰.

Más recientemente, gracias al avance de las técnicas de genética molecular y la estrategia de clonación posicional, comenzaron a identificarse los genes implicados en Charcot-Marie-Tooth y se modificó la nomenclatura hablándose desde entonces de neuropatía de Charcot-Marie-Tooth 1 y 2 (CMT1 y CMT2). El descubrimiento por parte de Bird y colaboradores del ligamiento para CMT1 en el cromosoma 1 y del equipo de Vance en el 17 propició la separación en CMT1B y CMT1A^{11,12} respectivamente. Además, en algunas familias que compartían sintomatología no se encontró ligamiento por lo que comenzó a hablarse de CMT1C. En el año 1989, Haites describió un nuevo ligamiento para el cromosoma X, creándose el nuevo grupo CMTX¹³.

Actualmente se conocen más de 40 loci implicados en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y neuropatías relacionadas, en el que se incluyen

genes de multitud de procesos como la mielinización, la compactación de mielina, la dinámica mitocondrial, la comunicación entre células, los procesos de endocitosis, los componentes del citoesqueleto, factores de transcripción, etc.

ii) Clínica de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

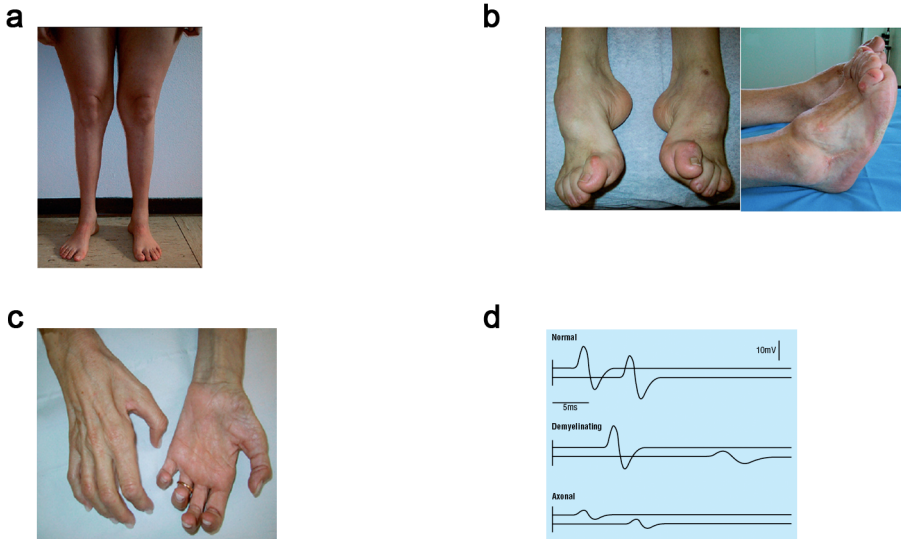


Figura 2. Afectaciones morfológicas de pacientes con la Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. (a) Degeneración muscular en piernas. (b) Deformidades en los pies (*pes cavus*). (c) Atrofia severa en los músculos de la mano. (d) Diagrama del potencial de acción en pacientes con CMT axonal, desmielinizante y pacientes sanos. Adaptado de Payerson, 2008 y Hughes, 2002.

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es un trastorno progresivo heterogéneo, con un fenotipo clínico común. Como ya hemos comentado, la enfermedad CMT se produce por genes implicados en procesos tan diversos como la compactación de mielina, el mantenimiento del citoesqueleto, las funciones mitocondriales, el tráfico vesicular, etc¹⁴.

Sorprendentemente y a pesar de la variabilidad genética y funcional de las proteínas implicadas, bien actúen en la mielina bien en el axón, la fisiopatología es el resultado de una degeneración axonal que se produce en primer lugar en los nervios más largos¹⁵.

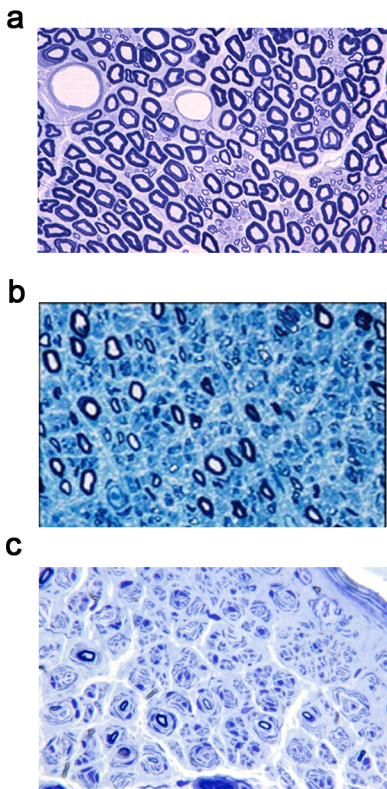


Figura 3. Biopsias de nervio sural. (a) Biopsia de un paciente sano. Adaptado de <http://neuropathology-web.org/> (b) Biopsia de un paciente con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth de tipo axonal. Adaptado de www.medscape.com (c) Biopsia de un paciente con CMT de tipo desmielinizante. Adaptado de www.frontalcortex.com

La manifestación clínica más importante que se produce en este tipo de trastorno es la debilidad progresiva de los músculos distales, con pérdida sensitiva aunque esta suele ser leve. La atrofia muscular que comienza en las piernas, marcadamente en el compartimento antero-lateral o peroneal, produce una morfología típica en la que la pierna toma aspecto de botella invertida (Fig. 2a). La afectación de los músculos de los pies condiciona la aparición de un *pes cavus* (Fig. 2b). La debilidad

muscular conlleva también defectos en la marcha ya que el paciente se ve obligado a levantar la rodilla. Este tipo de marcha se conoce como *steppage* o marcha equina. En estados más avanzados también se ven afectados los músculos de la mano dando el aspecto de mano en garra (Fig. 2c).

Como hemos comentado, las características electrofisiológicas y las biopsias de pacientes, han servido para la clasificación de la enfermedad en diferentes grupos. En un nervio sano, las velocidades de conducción nerviosa son de alrededor de 50 m/s. En la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth encontramos CMT desmielinizante o de tipo 1 (CMT1) en la que la VCN es menor a 38 m/s, y CMT axonal o de tipo 2 (CMT2) en la que las VCN son normales o ligeramente reducidas (Fig. 2d). Además, encontramos formas con VCN intermedias. Estas manifestaciones sugieren que los defectos en el nervio son diferente en cada caso.

Mediante biopsias de nervio sural se puede determinar la estructura típica de un nervio en donde se puede diferenciar las vainas de mielina y los axones (Fig. 3a). De este modo, en pacientes con VCN normales o ligeramente reducidas, se observa que la afectación es a nivel del axón reduciéndose considerablemente el número de axones (Fig. 3b). Por el contrario, una CMT con VCN reducida sugiere que el defecto primario es en la mielina, ya que es la encargada de la rápida transmisión del impulso nervioso; las biopsias de los pacientes con este tipo de CMT muestran procesos de desmielinización y remielinización con la formación de unas estructuras típicas denominadas bulbos de cebolla (Fig. 3c).

iii) Clasificación de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

Actualmente la clasificación de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth se basa en criterios morfológicos, fisiológicos y genéticos.

CMT1: CMT Desmielinizante Autosómica Dominante			
Tipo	Gen	Locus	Proteína
CMT1A	<i>PMP22</i>	17p11.2	Proteína periférica de la mielina 22 (duplicación 1,4 Mb)
CMT1B	<i>MPZ/PO</i>	1q22	Proteína cero de la mielina
CMT1C	<i>LITAF/ SIMPLE</i>	16p13.1-p12.3	Factor alfa del lipopolisacárido-TNF
CMT1D	<i>EGR2</i>	10q21.1-q22.1	ERG2
CMT1E	<i>PMP22</i>	17p11.2	Proteína periférica de la mielina 22 (mutación puntual)
CMT1F	<i>NEFL</i>	8p21	Neurofilamento ligero L

CMT2: CMT Axonal Autosómica Dominante			
Tipo	Gen	Locus	Proteína
CMT2A	<i>KIF1B</i>	1p36.2	Kinesina KIF1 β
	<i>MFN2</i>	1p36.2	Mitofusina 2
CMT2B	<i>RAB7</i>	3q21	RAB7

CMT2C	<i>TRPV4</i>	12q23-q24	Potencial receptor transitorio vaniloide 4
CMT2D	<i>GARS</i>	7p15	Glicil-tRNA transferasa
CMT2E	<i>NEFL</i>	8p21	Neurofilamento L
CMT2F	<i>HSPB1/HSP27</i>	7q11-q21	Proteína de choque térmico de 27kD
CMT2G	Desconocido	12q12-q13	Desconocida
CMT2H	Desconocido	8q12-q21.1	Desconocida
CMT2I/CMT2J	<i>MPZ/P0</i>	1q22	Proteína cero de la mielina
CMT2K	<i>GDAP1</i>	8q12-q21.1	GDAP1
CMT2L	<i>HSPB8/HSP22</i>	12q24	Proteína de choque térmico de 22kD
CMT2M	<i>DNM2</i>	19p12-p13.2	Dinamina 2
CMT2N	<i>AARS</i>	16q21-q23	Alanil-tRNA sintetasa

CMT Intermedia Dominante

Tipo	Gen	Locus	Proteína
DI-CMTA	Desconocido	10q24.1-q25.1	
DI-CMTB	<i>DNM2</i>	19p12-p13.2	Dinamina 2
DI-CMTC	<i>YARS</i>	1p34p35	Tirosil-tRNA sintetasa
DI-CMTD	<i>MPZ/P0</i>	1q22	Proteína cero de la mielina

CMT Intermedia Recessiva

Tipo	Gen	Locus	Proteína
RI-CMTA	<i>GDAP1</i>	8q12-q21.1	GDAP1
RI-CMTB	<i>KARS</i>	16q22.2-q22.3	Lysyl-tRNA sintetasa

CMT4: CMT Desmielinizante Autosómica Recessiva

Tipo	Gen	Locus	Proteína
CMT4A	<i>GDAP1</i>	8q13-q21.1	GDAP1
CMT4B1	<i>MTMR2</i>	11q22	Proteína relacionada con miotubularina 2
CMT4B2	<i>SBF2/</i> <i>MTMR13</i>	11p15	Proteína relacionada con miotubularina 13
CMT4C	<i>SH3TC2</i>	5q32	Proteína relacionada con tráfico vesicular
CMT4D/	<i>NDGR1</i>	8q24.3	NDGR1
NHSM-Lom			
CMT4E	<i>EGR2</i>	10q21.1-q22.1	EGR2
CMT4F	<i>PRX</i>	19q13.1-q13.2	L-Periaxina
CMT4G/	<i>HK1</i>	10q22-q23	Hexoquinasa 1
NHSM-Russe			
CMT4H	<i>FGD4</i>	12p11.21- q13.1	Frabina
CMT4J	<i>FIG4</i>	6q21	Fosfatasa relacionada con la síntesis de PtdIns(3,5)P ₂

AR-CMT2: CMT Axonal Autosómica Recesiva

Tipo	Gen	Locus	Proteína
AR-CMT2A	<i>LMNA</i>	1q21.2	Lamina A/C
AR-CMT2B	<i>MED25/ARC92/</i> <i>AC1D1</i>	19q13.3	Subunidad 25 del complejo mediador de la transcripción por ARN polimerasa II
AR-CMT2K	<i>GDAP1</i>	8q13-q21.1	GDAP1
AR-CMT2C	Desconocido	8q21.3	Desconocida

CMTX: CMT Ligada al X

Tipo	Gen	Locus	Proteína
CMTX1	<i>GJB1</i>	Xq13.1	Conexina 32
CMTX5	<i>PRSP1</i>	Xq21-q24	Fosforribosilpirofosfato sintetasa 1
Otras formas	Desconocido	Varias	Desconocida

ligadas X (CMTX2 a CMTX4)

4 *GDAP1*, el gen que produce CMT4A, AR-CMT2K, CMT2K y RI-CMTA

GDAP1 es una proteína pequeña que se ancla a la membrana mitocondrial externa y que, últimamente, se ha relacionado con procesos de dinámica mitocondrial. En el año 1999, Liu y colaboradores,

utilizando la línea de neuroblastoma de ratón Neuro2a, identificaron una serie de genes que numeraron del 1 al 10, y que veían su expresión aumentada al sobreexpresar GD3 sintasa, de ahí el nombre de *Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1* o GDAP1¹⁶.

En el año 2002 se relaciona por primera vez el gen *GDAP1* con la enfermedad de CMT. Cuesta y colaboradores¹⁷ identificaron ligamiento y mutaciones en el locus CMT4A en 8q21.1, originalmente descrita como desmielinizante, en tres familias con CMT axonal, mientras que, a su vez, Baxter y colaboradores publicaron el ligamiento del gen *GDAP1* en las familias con CMT desmielinizante originales con las que se había descrito el locus CMT4A¹⁸.

En los años siguientes se siguieron identificando mutaciones en *GDAP1* para formas tanto axonales como desmielinizantes, con VCN claramente disminuidas o normales y de herencia dominante o recesiva¹⁹⁻²².

En el año 2004, Marco y colaboradores.²³ realizaron un análisis evolutivo y estructural de la proteína GDAP1 a la que incluyeron dentro del grupo de las proteínas *GST-like*. La proteína GDAP1 estaba conservada en mamíferos, pájaros, anfibios y peces. Además también se encontraban secuencias similares en *Drosophila*. Sin embargo, lo más característico de este estudio fue la localización de un dominio denominado $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop entre dos dominios GST, exclusivo de vertebrados. Además, se caracterizó la presencia de una región Ct de carácter hidrofóbico que correspondería con dominios transmembrana.

Un año después, Pedrola y colaboradores²⁴ demostraron que la proteína GDAP1 estaba relacionada con la mitocondria. GDAP1 colocalizaba con mitocondrias, además de que su sobreexpresión producía la fragmentación de la red mitocondrial. Además, se demostró la necesidad del extremo Ct para el anclaje a la mitocondria. Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto al patrón mitocondrial para diferentes mutaciones patológicas. Unos meses más tarde, Niemann y colaboradores confirmaron estos resultados implicando a la proteína en procesos de dinámica mitocondrial y localizando la proteína en membrana mitocondrial externa²⁵.

En el año 2008, se trató de encontrar diferencias en cuanto a la dinámica mitocondrial para diferentes mutaciones dominantes y recesivas. Pedrola y colaboradores²⁶ detectaron GDAP1 en neuronas motoras y sensitivas de la médula espinal, neuronas de Purkinje, neuronas piramidales del hipocampo, neuronas mitrales del bulbo olfatorio y neuronas corticales piramidales. La ausencia de GDAP1 en la materia blanca y raíces nerviosas hizo suponer que *GDAP1* no se expresaba en células de la glía. Además, se descartó la presencia de GDAP1 en células de Schwann y células satélite del ganglio de la raíz dorsal (DRG), aunque esto es un tema que aun se encuentra en controversia²⁵. Por otra parte, la expresión de diferentes mutaciones *missense* de *GDAP1* no parecía alterar los diferentes patrones mitocondriales en células en cultivo²⁶.

Estudios posteriores no han conseguido explicar la función de GDAP1. En el año 2009 se caracterizó la parte transmembrana Ct de la proteína y se vio que las mutaciones en esa zona están impidiendo el anclaje

correcto en la membrana mitocondrial externa²⁷. Sin embargo, ese mismo año se encontraron ciertas diferencias en cuanto al tipo de herencia de las mutaciones patológicas y su función. Niemann y colaboradores describen GDAP1 como un factor de fisión mitocondrial dependiente de FIS1 y DRP1. Estos autores obtienen diferencias en cuanto a los patrones mitocondriales en función del patrón mendeliano de herencia, de modo que las mutaciones recesivas tendrían defectos en fisión mitocondrial, mientras que mutaciones dominantes verían alterado la fusión mitocondrial con un consecuente aumento de estrés oxidativo²⁸.

En 2011 nuestro grupo ha publicado un trabajo en *S. cerevisiae* en donde se demuestra la relación de GDAP1 con la dinámica mitocondrial y el citoesqueleto. Utilizando una serie de mutantes de levadura deficientes en proteínas de dinámica mitocondrial, se encontró que GDAP1 era capaz de complementar y rescatar el fenotipo de los mutantes para el gen *Fis1p*. Además, se demostró que GDAP1 y Fis1p interactúan entre sí y con β -tubulina, proteína formadora de microtúbulos, planteándose que éste podría ser el mecanismo por el que ambas proteínas complementan²⁹.

Más recientemente, Noack y colaboradores han implicado a GDAP1 en el control de los niveles de glutatión y su relación con el estrés oxidativo. Además, mutaciones recesivas de GDAP1 actuarían modificando el potencial de membrana de la mitocondria dificultando la captación de Ca^{2+} por la mitocondria³⁰

Actualmente no existen más referencias en cuanto a GDAP1. Lo que si parece claro es la imposibilidad de separar los procesos de dinámica mitocondrial de otros procesos como transporte de mitocondrias³¹, estrés oxidativo^{32,33}, regulación de calcio³⁴, posicionamiento de mitocondrias^{35,36}, apoptosis³⁷, etc. Sin embargo, la función de GDAP1 y la fisiopatología de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth relacionada con GDAP1 (CMT-GDAP1) no se conoce bien y todavía está en estudio.

La clínica de la enfermedad de CMT relacionada con GDAP1 es variable en función del defecto molecular del gen. En general el patrón mendeliano es recesivo y la enfermedad es grave y de comienzo temprano. Durante el periodo de lactante o la infancia, se produce un retraso motor y posteriormente debilidad y deformidad de pies y manos causando una incapacidad grave²². En la adolescencia algunos pacientes desarrollan disfonía y parálisis de las cuerdas vocales, empezando por las cuerdas izquierdas que se encuentran inervada por el nervio recurrente más largo. Aunque la afectación de los nervios craneales no es frecuente en la enfermedad de CMT si que es una característica de la enfermedad producida por *GDAP1*¹⁵. De este modo, los pacientes con voz ronca presentan síntomas de insuficiencia respiratoria y se encuentran confinados a silla de ruedas, mientras que los que presentan las cuerdas vocales normales tienen afectación menos severa. Las biopsias de nervio sural de pacientes con enfermedad de CMT relacionada con GDAP1 muestran una predominancia de degeneración axonal con algunos signos de desmielinización.

Cuando el patrón mendeliano es dominante, por ejemplo en el caso de la mutación p.R120W, el fenotipo clínico es más moderado o incluso asintomático. La debilidad muscular comienza en las extremidades inferiores mientras que la musculatura proximal solo está afectada en estadios tardíos de la enfermedad. Ningún paciente presenta voz ronca. Aunque también se produce pérdida de fibras nerviosas, consecuente con la degeneración axonal, la pérdida es menor grado que con las mutaciones recesivas³⁸.

5 La mitocondria en los procesos de neurodegeneración.

Las enfermedades neurodegenerativas poseen una gran diversidad fenotípica. En los últimos años se ha visto que muchas de ellas comparten aspectos de la biología celular como defectos en los sistemas de control de calidad (estrés de retículo, trastornos de autofagia, acumulación de proteínas mal plegadas), estrés oxidativo, inflamación neuronal, defectos en el tráfico celular y alteraciones mitocondriales, tanto desde el punto de vista metabólico como en la dinámica mitocondrial y la comunicación con otros orgánulos.

Algunos de los trastornos neurodegenerativos en los que esta implicada la mitocondria son la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, la paraplesia espástica hereditaria, la atrofia óptica, la enfermedad de Parkinson, ataxias espinocerebelares y la enfermedad CMT³⁹.

i) Dinámica mitocondrial.

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos que migran, se dividen y se fusionan. Los ciclos de fusión y fisión aseguran la redistribución de metabolitos y la mezcla del DNA mitocondrial evitando la acumulación excesiva de mutaciones en un mismo orgánulo.

Las mitocondrias son esenciales en todos los tipos celulares pero más aún en células neuronales ya que éstas demandan grandes cantidades de energía, regulación del Ca^{2+} , mantenimiento de los potenciales de membrana, redistribución de neurotransmisores y otras funciones⁴⁰.

Los procesos de dinámica mitocondrial son altamente necesarios para el mantenimiento de la célula. Así, la fisión mitocondrial permite la renovación de las mitocondrias, redistribución y proliferación en las sinapsis³⁷. Por el contrario, los procesos de fusión mitocondrial permiten a las mitocondrias interaccionar y comunicarse entre ellas, facilitan el movimiento y la distribución a lo largo del axón y en las sinapsis⁴¹ (Fig. 4a).

Los procesos de dinámica mitocondrial no están aun firmemente establecidos pero, sin embargo, se conocen bien la maquinaria molecular implicada, sobre todo en la levadura *Sacharomyces cerevisiae* y también en células de mamíferos.

Se conocen dos proteínas implicadas en fisión mitocondrial, FIS1 y DRP1 (Dinamyn Related Protein 1), la primera con función no muy clara mientras que la segunda se encargaría de proporcionar la fuerza necesaria para la fisión formando un anillo que estrangula y divide la

mitocondria (Fig. 4b). La sobreexpresión de DRP1, por ejemplo, produce un aumento del número de mitocondrias en dendritas favoreciendo la formación de sinapsis en neuronas en cultivo de hipocampo⁴², lo que ha llevado a pensar en que la fisión mitocondrial es necesaria para el mantenimiento y la formación de sinapsis.

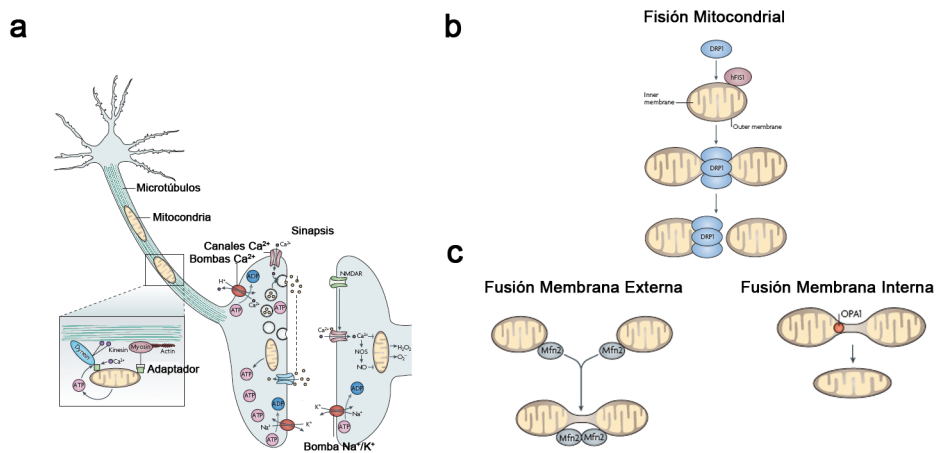


Figura 4. Procesos de dinámica mitocondrial. (a) Importancia de la mitocondria en células neuronales. (b) Fisión mitocondrial. (c) Procesos de fusión mitocondrial. Adaptado de Knott, 2008.

Por el contrario, los procesos de fusión mitocondrial son más complejos ya que requieren de la fusión y mantenimiento de las dos membranas mitocondriales. Dicho proceso está regulado por las proteínas Mitofusinas 1 y 2 (MFN1 y MFN2) en la membrana externa y la proteína OPA1 en el espacio intermembrana. Ambas proteínas, empleando GTP, se encargarían de acercar las membranas para su fusión (Fig. 4c). Las mutaciones en estas proteínas se han relacionado con la enfermedad CMT2A y la atrofia óptica autosómica dominante, respectivamente.

La enfermedad de CMT producida por mutaciones en *MFN2* fue descrita en el año 2004⁴³ presentándose desde entonces como la CMT axonal mas frecuente. Las mutaciones en el gen *OPA1* producen atrofia óptica estando esta manifestación presente también en los casos más graves de pacientes con mutaciones en *MFN2*, lo que indica la importancia de las proteínas de fusión mitocondrial en la función del nervio óptico⁴⁴.

Además de alteraciones en los procesos de fusión mitocondrial^{45, 46}, las mutaciones en el gen *MFN2* se han relacionado con alteración de procesos de transporte mitocondrial⁴⁷, contactos entre la mitocondria y el retículo endoplásmico⁴⁸, metabolismo, apoptosis, forma de orgánulos y progresión de ciclo celular⁴⁹.

Recientemente, algunas mutaciones en el gen *DNM1L* que codifica para la proteína DRP1, se han relacionado con un síndrome con microencefalopatía, desarrollo anormal del cerebro, atrofia óptica y acidosis láctica⁵⁰.

ii) Transporte de mitocondrias

El transporte activo de mitocondrias en las células neuronales es un componente indispensable para el mantenimiento de la función neuronal y de las sinapsis. Del mismo modo que los procesos de dinámica mitocondrial, el transporte de las mitocondrias es indispensable para la renovación de la red mitocondrial y el movimiento a zonas de alta demanda energética⁵¹.

El transporte de mitocondrias se produce en dos sentidos, el transporte anterógrado mediado por las proteínas kinesinas y el transporte

retrógrado mediado por dineínas. En ambos casos, la implicación de la mitocondria requiere de adaptadores que intermedian la correcta disposición del orgánulo alrededor de los microtúbulos^{52, 53}.

Al igual que en los procesos de fisión y fusión mitocondrial, la acumulación de daño mitocondrial debido a la falta de renovación de mitocondrias o la carencia de energía en las sinapsis, puede suponer la activación de las cascadas de muerte celular desencadenadas por la mitocondria.

Se han observado procesos alterados en el transporte de mitocondrias tanto en enfermedades neurodegenerativas que implican transportes a larga distancia como aquellos que implican neuronas de axones más cortos. Por ejemplo, en neuronas motoras de ratones con ELA (esclerosis lateral amiotrófica), en donde las mitocondrias deben viajar largas distancias, se ha visto deficiencias en el transporte mitocondrial^{54, 55}; en la enfermedad de Alzheimer, que implica neuronas de axones cortos (córtez e hipocampo)⁵⁶ y en la enfermedad de Huntington, que afecta a neuronas con axones aún mas cortos, también se han relacionado con defectos en el transporte de las mitocondrias⁵⁷.

6 Homeostasis del calcio

El ion calcio (Ca^{2+}) tiene un importante papel en la regulación de la dinámica y estructura de las células nerviosas. Además de formar parte de rutas de señalización como segundo mensajero tiene la capacidad de regular muchas proteínas sensibles a Ca^{2+} en procesos tan diversos como metabolismo, apoptosis, movimiento, estructuración de la célula, etc.

Dada su alta variabilidad como regulador de proteínas, el calcio debe de estar retenido en almacenes celulares y altamente regulado.

El retículo endoplásmico es el orgánulo en donde se almacena Ca^{2+} de forma mayoritaria. En sus membranas se acumulan bombas y intercambiadores de Ca^{2+} que mantienen las concentraciones del ion en el citoplasma hasta 10.000 veces menor que en el medio extracelular⁵⁸. En segundo lugar, la mitocondria también juega un papel importante en la regulación de Ca^{2+} . Recientemente se ha descrito la identidad del uniportador de calcio mitocondrial que durante muchos años ha estado en estudio⁵⁹, aunque, además, se conocen otros sistemas de captación de calcio por parte de la mitocondria, como bombas e intercambiadores⁶⁰. Finalmente otros orgánulos minoritarios como vesículas, aparato de Golgi y vacuolas, tienen entre sus funciones el almacenaje de calcio.

La señalización por calcio esta restringida a dominios cercanos a la membrana plasmática y entre la mitocondria y el RE⁶¹. El vaciado de calcio del RE hacia la mitocondria provoca la activación de canales de la membrana plasmática que permiten la readmisión de calcio, proceso conocido como SOCE (*Store-Operated Ca^{2+} Entry*) a través de canales activables por calcio pertenecientes a la familia de los canales CRAC (*Calcium Release Activation Calcium*). La proteína STIM1 es una proteína residente de la membrana del RE que funciona como sensor de calcio. La ausencia de calcio en el retículo endoplásmico provoca la dimerización de STIM1 y la migración hacia la membrana plasmática donde interacciona con la proteína de canal de calcio Orai1⁶². Recientemente se ha descrito la regulación de la migración de STIM1 y, por consiguiente

del SOCE, por parte de la proteína MFN2³⁶. Es necesario además que las mitocondrias sean metabólicamente activas y sean capaces de captar calcio para que el proceso sea de manera eficiente⁶³.

El calcio que entra por los canales CRAC es captado por mitocondrias próximas a membrana plasmática y que, posteriormente, cargarán de nuevo el RE. La señalización por SOCE dirige procesos de exocitosis, estimula el metabolismo mitocondrial, activa la expresión génica y promueve el crecimiento y diferenciación celular⁶⁴.

El mecanismo de SOCE se encuentra regulado por la mitocondria. La entrada de calcio hacia la mitocondria activa el metabolismo. El ácido pirúvico hiperpolariza la mitocondria con lo que se obtiene energía, promoviendo que el SOCE sea más eficiente. Del mismo modo, la disipación del potencial de membrana mitocondrial inhibe la entrada de calcio a la mitocondria inactivándose el mecanismo. A su vez, el incremento de calcio citosólico evita el movimiento de la proteína STIM1 hacia la membrana plasmática promoviendo la inhibición de la entrada de calcio y previniendo la sobrecarga⁶⁵.

El SOCE es un mecanismo desconocido a nivel de células nerviosas. Es un proceso muy estudiado en células musculares^{66, 67} y en las sinapsis inmunológicas^{68, 69} aunque, recientemente, se han publicado trabajos en donde se relaciona el SOCE con la regulación de la actividad neuronal y el metabolismo⁷⁰⁻⁷².

Otro mecanismo muy importante en cuanto a la homeostasis de calcio es la comunicación entre la mitocondria y el RE. Este proceso está

localizado en unas regiones denominadas MAMs (*mitochondria associated membranes*) en la que existen proteínas específicas para la comunicación entre los dos orgánulos⁷³, además de estar enriquecidas en otro tipo de proteínas como IP3R, encargado de la transferencia de calcio, o FALC1, relacionada con el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga⁷⁴. Recientemente se ha descrito la presencia de dos proteínas de dinámica mitocondrial como MFN2⁴⁸ y Fis1⁷⁵ en las MAMs.

La comunicación entre los dos orgánulos es un proceso dinámico que implica procesos de movimiento y dinámica mitocondrial. Cualquier alteración de estos procesos puede suponer la ruptura de la comunicación y alterar la homeostasis de calcio, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer⁷⁶. Ejemplos de enfermedades neurodegenerativas relacionadas directamente con alteración de las MAMs son la enfermedad de Huntington, en donde tanto huntingtina como HAP1 interactúan con las proteínas IP3R⁷⁷, y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 2A con la implicación de MFN2⁷⁸.

7 Diferenciación neural mediada por neurotrofinas

El establecimiento de líneas celulares humanas es una tarea complicada debido a la dificultad de su obtención y de cultivo. Las células SH-SY5Y son una línea celular derivada de un neuroblastoma humano que ofrecen un buen sistema para el estudio de células nerviosas. Estas células poseen un cariotipo similar al de las células humanas normales ya que solamente tienen una duplicación de un fragmento del cromosoma 1⁷⁹. Además, se han desarrollado diferentes métodos con los que diferenciar las SH-SY5Y a células tipo neuronas⁸⁰⁻⁸².

Las neurotrofinas, por su parte, resultan indispensables para el mantenimiento y supervivencia de las células neuronales produciéndose muerte por apoptosis cuando las células se ven privadas de ellas^{83, 84}. Las neurotrofinas como el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) y el Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF) son las más estudiadas y ayudan considerablemente a la supervivencia y diferenciación de células nerviosas tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos factores de crecimiento interactúan con sus receptores Trk en la membrana plasmática de las células desencadenando cascadas de señalización que permiten la supervivencia y mantenimiento de las poblaciones celulares⁸⁵.

El ácido retinoico es una de las formas de la vitamina A considerada como una hormona esteroidea que regula la expresión de genes implicados en el mantenimiento y diferenciación celular. Se ha descrito que en células SH-SY5Y, la expresión de receptores Trk está inducida por la exposición continuada al ácido retinoico⁸⁶, permitiendo de este modo el efecto de la neurotrofina BDNF.

Se ha descrito que el BDNF activa una serie de rutas de señalización implicadas en supervivencia y diferenciación como la ruta PI3K, la ruta ERK y la ruta PLC- γ ⁸⁶, por lo que es fácil entender el porque la disfunción de estas rutas está relacionada con diferentes tipos de cáncer⁸⁷. La activación de estas rutas inhiben la función de caspasas y la liberación de citocromo c^{88} y también de GSK3 β , una proteína que media en muchos procesos regulando la localización de β -catenina y la expresión de genes, degradación de proteínas, etc⁸⁹. Durante el proceso de diferenciación, la estimulación de las rutas dependientes de PI3K regula

la expresión de genes implicados en funciones neurales y no neurales, incluso regula la expresión de GDAP1⁹⁰. La activación de estas rutas termina en la adquisición de las características típicas de células nerviosas, el ensamblaje de microtúbulos y adquisición de estabilizadores para el mantenimiento de axones, dendritas, etc. El efecto de la mitocondria en estas rutas se establece en base a la necesidad de aporte de energía en los procesos que conllevan el mantenimiento de las células neuronales y en los procesos de regulación de rutas de señalización.

8 Estrés oxidativo

El aumento en las especies reactivas de oxígeno (*ROS*) en la célula debido a los procesos de metabolismo celular es considerado como el principal causante de los procesos de envejecimiento. En condiciones normales, el daño producido por las especies reactivas de oxígeno es rápidamente reparado por los sistemas de protección de la célula. Cuando se produce un desequilibrio entre la producción y la eliminación se genera el denominado estrés oxidativo⁹¹.

La mitocondria y los lisosomas son los orgánulos considerados como los mayores productores de *ROS* y de estrés oxidativo debido a sus funciones biológicas características⁹². En los últimos años se está viendo al retículo endoplásmico como uno de los orgánulos diana en el efecto producido por el estrés oxidativo⁹³. Este orgánulo es el encargado del plegamiento y distribución de la mayor parte de proteínas generadas en la células. El estrés producido por los diferentes orgánulos afecta directamente al plegamiento de las proteínas. La célula responde

activando la expresión de chaperonas y proteínas para la eliminación de los radicales de oxígeno a la vez que potencia los sistemas de detoxificación como la autofagia⁹⁴⁻⁹⁶. Si las células no son capaces de corregir los defectos en el plegamiento de las proteínas se genera un estrés conocido como estrés de retículo que puede llevar a la activación de las cascadas de muerte celular.

Muchas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Huntington o Parkinson, presentan agregados de proteínas mal plegadas que alteran funciones celulares importantes como el transporte, producción de estrés oxidativo, inhibición del proteosoma y otras^{97, 98}.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 Material Biológico

i) Bacterias

Las cepas utilizadas en este trabajo han sido DH5 α y KC8, ambas de *Escherichia coli* (*E. Coli*). La cepa DH5 α (F- endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 deoR nupG lacZAM15 hsdR17) se ha utilizado para la replicación y obtención de los plásmidos utilizados a lo largo del trabajo. La cepa KC8 (hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463, lac Δ X74, strA, galU,K) se ha utilizado para recuperar y secuenciar los plásmidos obtenidos como interactores de GDAP1 en el ensayo de doble híbrido.

Todas las bacterias se han crecido en general en medio completo LB (10g/L triptona, 5g/L extracto de levadura, 5g/L NaCl) a 37°C en solido o liquido con agitación y suplementado con ampicilina 50ug/ul o kanamicina 50ug/ul en función de la resistencia que posea el plásmido a obtener. Para la selección de plásmidos específicos en la cepa KC8 se utiliza medio M9 sin leucina (sales M9 (13g/L Na₂HPO₄, 3g/L KH₂PO₄, 0,5g/L NaCl, 10g/L NH₄Cl), 14mM NaOH, 0,1%Glucosa, 100ug/ul Ampicilina, 1mM Tiamina, 2mM MgSO₄, 0,1mM CaCl₂, 1x DO (30mg L-Isoleucina, 150mg L-Valina, 20mg L-Adenina, 20mg L-Arginina, 20mg L-Histidina, 30mg L-Lisina, 20mg L-Metionina, 50mg L-Phenilalanina, 200mg L-Treonina, 20mg L-Triptófano, 30mg L-Tirosina, 20mg L-Uracilo)

Para introducir los plásmidos en bacterias se transformaron por electrotransformación tanto DH5 α como KC8. Las bacterias son expuestas, en presencia del plásmido, a un pulso de 1700V que produce

la entrada del DNA en la célula. Las bacterias se dejan recuperar 1 hora a 37°C y se siembran en LB con el correspondiente antibiótico.

ii) Levaduras

La cepa utilizada en este estudio es TAT7 (MATa ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80 LYS2::lexAop-HIS3, URA3::lexAop-lacZ). Dicha cepa presenta mutaciones en genes de rutas de síntesis de aminoácidos que permiten la selección de plásmidos. Además, posee dos genes bajo el control de operadores de LexA (LYS2::lexAop-HIS3, URA3::lexAop-lacZ) utilizados como genes reporteros en el ensayo de doble híbrido. De este modo, si hay interacción de dos proteínas, la levadura puede crecer en ausencia de histidina y, además, produce la enzima β -galactosidasa que, en presencia de X-Gal produce un color azul que permite la rápida selección. Los cultivos TAT7 se crecieron en medio completo YPD (2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% glucosa pH 6) o en medio sintético completo (glucosa 2%, 0,67% *Yeast Nitrogen Base* (Difco™) y, 0,095% mezcla de aminoácidos) a 30°C en agitación con ausencia de triptófano (-trp) o leucina (-leu) en función del plásmido a obtener.

La transformación de levaduras se llevó a cabo por medio del método de acetato de litio⁹⁹. Para ello se crecieron los microorganismos en YPD o SC hasta obtener una DO₆₀₀ de entre 0,4 – 0,6. Una vez alcanzada, se separan 10ml de cultivo por transformación y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos. El pellet resultante se lava dos veces con AcLi/TE 1x (0,1M acetato de litio pH 7,5, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8) y, finalmente, se resuspende en 100ul de este mismo tampón, al que se añaden 10ul de esperma de salmón (100mg/ml) totalmente desnaturalizado por calor,

0,5ug aproximadamente del plásmido a transformar y, 300ul de AcLi/TE/PEG 40%. Tras mezclar bien, las células se dejan a 30°C durante 1 hora y se someten a un choque térmico a 42°C en presencia de DMSO al 10%. Finalmente las células se lavan tres veces con agua estéril y se siembran en la placa correspondiente en función del plásmido a conservar.

iii) Células de mamíferos en cultivo

Durante todo el trabajo se han utilizado dos tipos de células humanas inmortales: HeLa y SH-SY5Y, cada una con sus características especiales.

a. HeLa

Es una línea celular epitelial procedente de un carcinoma cervical obtenidas en 1951. Se usan ampliamente en el laboratorio debido a su facilidad de crecimiento y transfección.

Este tipo celular crece en medio DMEM con 10% de FBS inactivado, 2mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100ug/ml de estreptomicina a 37°C y 5% de CO₂.

b. SH-SY5Y

Es una línea celular derivada de un neuroblastoma procedente de la línea SK-N-SH obtenida en 1978. Dado su origen y sus características neurales se usa como modelo para el estudio de este tipo de tejido y sus afecciones siendo además, susceptible a diferenciación.

SH-SY5Y crece en medio DMEM F-12 (DMEM suplementado con Mezcla de Nutrientes F-12) suplementado con 10% de FBS, 2mM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100ug/ml de estreptomicina a 37°C y 5% de CO₂.

2 Ensayo de Doble Híbrido

i) Vectores

a. pBTM116.

Para el ensayo de doble híbrido se utilizó el vector pBTM116 (Fig. 5a), el cual posee un dominio de unión al DNA procedente de bacterias llamado LexA (*Binding Domain*, BD). A partir de construcciones previas del laboratorio, se generaron nuevas construcción en la cual se fusionaron GDAP1, mutaciones de cambio de sentido, o dominios de GDAP1 con el dominio de unión al DNA LexA. En el caso del ensayo de doble híbrido, se eliminaron los segmentos transmembrana que anclan la proteína a la mitocondria, para facilitar la interacción con las posibles proteínas, ya que en este tipo de experimento, las interacciones se da en el núcleo de la célula.

Las construcciones que se han realizado para este vector se recogen en la Tabla 1.

b. pACT2

Vector proveniente de una librería de cDNA comercial utilizada para el análisis de Doble Híbrido. En dicho vector se ha clonado una librería de cDNA humano de cerebro de abortos espontáneos de fetos de 20-25 semanas, fusionado con un dominio de activación de la transcripción de bacterias (*Activation Domain*, AD) imprescindible para el análisis de doble híbrido (Fig. 5b).

ii) Transformación de levaduras para el ensayo de doble híbrido

La cepa TAT7 fue transformada con la construcción pBTM116-GDAP1::LexA. Una vez comprobada la expresión de la proteína así como

la ausencia de toxicidad para la levadura, se transformó con el plásmido pACT2 vacío a modo de testar la posible auto-activación de los genes reporteros de interacción.

Después de descartar la auto-activación de GDAP1, se transformó la cepa TAT7 pBTM116-GDAP1::LexA con la genoteca de cerebro humano fetal. Los resultantes de la transformación se sembraron en placas SC – trp –leu –his y se incubaron 3 días a 30°C. Además, se sembró una placa con SC –trp –leu a modo de control para poder contabilizar los clones ensayados. Las colonias resultantes se replicaron en nuevas placas y se realizaron ensayos de β -galactosidasa en filtro para confirmar la interacción.

Tabla 1. Relación de plásmidos utilizados en los diferentes ensayos de Doble Híbrido. Se muestra el origen del cDNA y los oligonucleótidos con los que se ha clonado. Los oligonucleótidos con lo que se han clonado los cDNAs se encuentran recogidos en el Anexo 1.

Nombre	Proteína	Origen	Oligonucleótidos
pBTM116-GDAP1	GDAP1 (Δ 310-358)	pGEM-T-GDAP1	1162 - 1163
pBTM116-GSTNt	GDAP1 (p.24-105)	pBTM116-GDAP1	1260 – 1261
pBTM116-Loop	GDAP1 (p.106-152)	pBTM116-GDAP1	1262 – 1263
pBTM116-GSTCt	GDAP1 (p.153-309)	pBTM116-GDAP1	1264 – 1265
pBTM116-TRMB	GDAP1 (p.310-358)	pGEM-T-GDAP1	1266 - 1267

pBTM116-R120Q	GDAP1 p.R120Q	pEGFP-C1- R120Q	1162 - 1163
pBTM116-R120W	GDAP1 p.R120W	pEGFP-C1- R120W	1162 - 1163
pBTM116-T157P	GDAP1 p.T157P	pEGFP-C1- T157P	1162 - 1163
pBTM116-R161H	GDAP1 p.R161H	pEGFP-C1- R161H	1162 - 1163
pBTM116-R282C	GDAP1 p.R282C	pEGFP-C1- R282C	1162 - 1163

iii) Ensayos β -galactosidasa

Para el ensayo β -galactosidasa en filtro¹⁰⁰ se transfirieron clones aislados a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) y se congelaron a -80°C para favorecer la rotura de las membranas celulares. Seguidamente se puso en contacto los filtros con una solución de tampón Z (40mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 60mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10mM KCl, 1mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50mM β -Mercaptoetanol, pH 7) y 1mg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-Galactopiranosido). La reacción se produce a 30°C por un máximo de 2 horas.

Con el fin de cuantificar los niveles de interacción de GDAP1 y diversas mutaciones con las proteínas obtenidas, se transformaron en parejas los plásmidos correspondientes pBTM116 con los plásmidos pACT2 obtenidos en el ensayo de doble híbrido. Las levaduras transformadas se crecieron en medio SC $-\text{trp} -\text{leu}$ y se incubaron a 30°C . Se replicaron 5

colonias aisladas en placas nuevas y, una vez crecidas, se sembraron en SC -trp -leu líquido y se dejaron crecer toda la noche. Al día siguiente se tomó una cantidad de células correspondiente a una densidad óptica a 600nm de 0,5. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de tampón Z al que se le añadió 25ul de SDS al 0,1% y 25ul de cloroformo. A la mezcla se le añadió 200ul de una solución de ONPG 4mg/ml y se incubó a 30°C. La reacción se para tras la aparición de color amarillo con 500 ul de una solución de Na₂CO₃ 1M. Las muestras se centrifugaron y se midió la absorbancia del sobrenadante a 420nm. Los datos se expresan en Unidades Miller¹⁰¹.

iv) Extracción de los plásmidos interactores.

Una vez confirmados los interactores por este método se pasó a la determinación de las proteínas correspondientes. Para ello se extrajeron los plásmidos con el kit comercial Zymoprep ® Yeast Plasmid MiniPreparation Kit. Para seleccionar únicamente el plásmido pACT2, se transformaron por electrotransformación bacterias *E. Coli* KC8 y se sembraron en medio LB suplementado con ampicilina 50ug/ul. Las colonias resultantes de la incubación a 37°C se replicaron en placas M9. Las colonias que crecieron en medio solido, se crecieron después en LB líquido para proceder a la extracción del plásmido. Una vez obtenidos, los insertos se secuenciaron utilizando el oligo nº 1218. Las secuencias resultantes se compararon en las bases de datos para su determinación. En resumen, se realizó un rastreo de entre 200.000 y 250.000 clones independientes. De estos, se obtuvieron 210 positivos de entre los que se

encuentran falsos positivos típicos, proteínas no conocidas en la actualidad detectados como *contigs* genómicos y proteínas ya conocidas. Finalmente, para determinar la zona en la que GDAP1 interacciona con las proteínas obtenidas se transformaron por parejas las construcciones de los dominios de GDAP1 con pBTM116 junto con la proteína de interés. Las colonias resultantes se crecieron en medio SC -trp -leu y se sometieron al análisis de β -galactosidasa en filtro.

3 Modelo de Sobreexpresión. Confirmación de las Interacciones

i) Vectores

a. pCMV

Vector comercial para expresiones transitorias que lleva incluido una etiqueta, bien HA o c-myc (Fig. 5c). Se utiliza para clonar genes fusionados con la etiqueta en el extremo amino terminal (Nt) de la proteína. De este modo se puede localizar la proteína utilizando anticuerpos contra la etiqueta. En dicho vector se han clonado las siguientes proteínas tanto con la etiqueta c-myc como HA. La relación de proteínas clonadas en estos vectores se muestra en la Tabla 2.

Para la comprobación de la correcta clonación, los insertos se secuenciaron con el oligo nº 928 que hibrida en la zona anterior a la etiqueta, con lo que se puede comprobar tanto la pauta de lectura correcta como la presencia de mutaciones en el inserto.

En el caso de los genes RAB6B, se crearon dos isoformas con diferentes funciones. La isoforma p.Q72L, es una forma activa de manera constitutiva, al contrario que la p.T27N que es una forma dominante

negativa. Ambas isoformas se crearon por mutagénesis dirigida utilizando el kit *Site Directed Mutagenesis* de Stratagene.

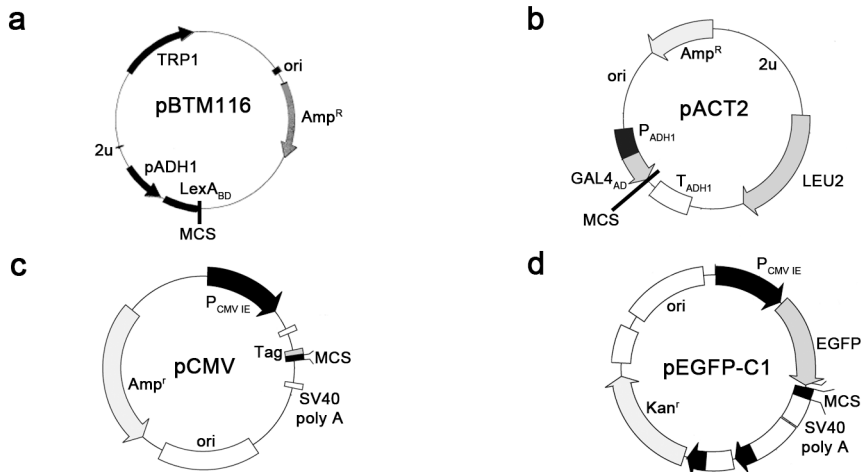


Figura 5. Vectores de clonación. (a) pBTM116, vector usado para los ensayos de doble híbrido. TRP, gen para el crecimiento en ausencia de triptófano; Amp^r, gen que permite el crecimiento en presencia de Ampicilina; pADH1, promotor de la alcohol dehidrogenasa de levaduras; LexA^{BD}, dominio de unión a operadores LexA. (b) pACT2, vector en el que se encuentra clonada la genoteca de cerebro humano. Leu2, gen que permite el crecimiento en ausencia de Leucina; T_{ADH1}, terminador de la alcohol dehidrogenasa; GAL4^{AD}, dominio de activación de la transcripción GAL4. (c) pCMV, vector de expresión de células de mamífero en donde se pueden fusionar proteínas en su extremo Nt con HA o c-myc. P_{CMV IE}, promotor del virus CMV; Tag, etiqueta HA o c-myc; SV40 Poly A, señal de poliadenilación del virus SV40. (d) pEGFP-C1, vector de expresión de células de mamífero en el que se pueden fusionar proteínas en su extremo Nt con GFP. Kan^r, gen de resistencia a Kanamicina; EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente aumentada.

b. pEGFP-C1

Vector comercial para expresiones transitorias que posee la proteína verde fluorescente GFP (Fig 5d). Este vector permite la clonación en Nt de proteínas en pauta con la GFP de modo que puede ser rápidamente detectada con microscopía de fluorescencia y permite la visualización de

células in vivo. Para este vector se utilizaron construcciones ya realizadas en el laboratorio en las que se clonaron insertos completos de GDAP1 y diferentes mutaciones en pauta con la proteína GFP.

Tabla 2. cDNAs clonados en los vectores pCMV-c-myc y pCMV-HA. Se muestra el origen del cDNA y los oligonucleótidos con los que se ha clonado. Los oligonucleótidos con lo que se han clonado los cDNAs se encuentran recogidos en el Anexo 1. * Mutaciones *miss-sense* de GDAP1: p.R120Q, p.R120W, p.T157P, p.R161H, p.R282C.

Nombre	Origen	Oligonucleótidos
pCMV-GDAP1	pGEM-T GDAP1	1258 - 1259
pCMV-TUBB	ORF GeneService	1336-1337
pCMV-RAB6B	ORF Origen	1399 - 1400
pCMV-RAB6B	pCMV-RAB6B	1429 - 1430
p.Q72L		
pCMV-RAB6B	pCMV-RAB6B	1836 - 1837
p.T27N		
PCMV-PIKfyve Ct	cDNA SH-SY5Y	1541-1543
pCMV-Caytaxin	ORF GeneService	2672 - 2673
pCMV-GABARAP	cDNA SH-SY5Y	1240-1243
pCMV-TMEM106C	ORF GeneService	1955 - 1956
pCMV-INA	ORF GeneService	1802 - 1803
pCMV-GDAP1*	pEGFP-GDAP1	1258-1259

ii) Transfección de células de mamífero HeLa

Para las células HeLa se sembraron 15.000 células/cm² para Inmunofluorescencias Indirectas o 30.000 células/cm² para coimmunoprecipitaciones, y se dejaron 24 horas en el incubador para

permitir que se depositen en la placa. Pasado este tiempo se transfectaron con FUGENE 6 (Roche) a una relación de 5ul de FUGENE por cada 2ug de DNA siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 24 horas se procedió a procesar las células en función del experimento.

iii) Coimmunoprecipitación (coIP)

Las células transfectadas se levantaron de la placa con tripsina y se lavaron con PBS. El pellet resultante se resuspendió en el tampón de lisis (50mM HEPES KOH pH 7,2, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1% Tritón X-100, inhibidor de proteasas 1x (Roche), se incubó durante 1 hora a 4°C y se centrifugó para obtener las proteínas solubles. Para la coIP se usaron 500ug de proteína total con 5ul de anticuerpo anti-c-myc policlonal (Sigma-Aldrich) de conejo. La mezcla se incubó en agitación durante 4 horas en un volumen total de 200ul.

La proteína G conjugada con sefarosa (GE Healthcare) se lavó al menos 3 veces con el tampón de lavado (10mM HEPES KOH pH 7,2, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0,2% Tritón X-100) y se incubó con la mezcla de proteínas y anticuerpo durante toda la noche. Tras este tiempo, se centrifugaron las muestras y se lavó el pellet de proteína G-Sefarosa al menos 3 veces con tampón de lavado. Finalmente, se resuspendió la proteína G-sefarosa con tampón de carga Laemli SDS-PAGE (63mM Tris-HCL, 10% glicerol, 2% SDS, 0,0025% azul de bromofenol, pH 6,8) y se hirvió durante 10 minutos antes de cargar las muestra en un gel SDS-PAGE para su análisis.

En el caso de la coIP de las proteínas RAB6B, al tratarse de GTPasas, el tampón de lisis contenía además 0,5mM de GTP o GTP γ S, para la coIP de RAB6B p.Q72L y RAB6B respectivamente.

4 Geles Nativos

Con la finalidad de observar la posible formación de complejos en la membrana mitocondrial con otras proteínas por parte de GDAP1, se realizaron electroforesis en condiciones nativas de extractos mitocondriales. Esta técnica, conocida como Blue Native – PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida)¹⁰², permite la separación en una primera dimensión de los complejos de membrana según su tamaño y, en una segunda dimensión, la separación de los componentes de los complejos.

Así, a partir de dos placas de 150 cm² confluentes de SH-SY5Y, se recogieron las células y se resuspendieron en tampón de extracción de mitocondrias (10mM Tris-HCl pH 7,4, 0,3 M Sacarosa, 1mM EDTA, 5mM DTT, inhibidor proteasas 1x). Las muestras se pasaron por un homogeneizador esmerilado de vidrio con émbolo tipo *Tight*, (Wheaton) con 3 ciclos de 10 pases con descanso de 10 segundos por ciclo en hielo. La muestra resultante se centrifugó a 3.000 g y, el sobrenadante, se volvió a centrifugar a 15.000 g para obtener las mitocondrias. El pellet de mitocondrias se resuspendió en 100 ul de tampón A (1,5M ácido aminocaproico, 50mM Bis-Tris HCl pH 7) y se añadió 1,6 % DDM (n-Dodecyl-beta-D-Maltoside). La muestra se incubó 5 minutos en hielo y finalmente se centrifugó para obtener el sobrenadante con las proteínas solubles. Tras cuantificar la muestra se añadió tampón de carga (75mM

ácido aminocaproico, 5mM Bis-Tris HCl pH 7, 0,05mM EDTA y 0,5% Serva Blue G). Para correr la primera dimensión se utilizaron 80ug de proteína en geles de poliacrilamida NativePAGE™ Novex® 3-12% Bis-Tris 1.0mm. Los geles se corrieron durante dos horas a 4°C con tampón BTT (50mM Bis-Tris, 800mM tricina) en el ánodo y, tampón Dark Blue (50mM Bis-Tris, 800mM Tricina, 0,2 g/L Serva Blue G-250) en el cátodo. Por otra parte, para el análisis del efecto de las mutaciones, se procedió como lo explicado anteriormente partiendo de dos placas de 50 cm² de células HeLa confluentes y transfectadas con 0,2ug/cm² del plásmido correspondiente.

Como marcador de la primera dimensión en condiciones nativas se utilizó el marcador Native PAGE™ Novex® Bis-Tris Gel System y, para la segunda dimensión los anticuerpos anti-ATPasa Complejo V, anti-citocromo oxidasa complejo II y anti-citocromo oxidasa complejo I.

5 Fraccionamiento Subcelular y Centrifugación Diferencial

A partir de dos placas confluentes de 150cm² con células SH-SY5Y, se procedió a la separación de orgánulos según lo describen Coppi y colaboradores¹⁰³.

Como marcadores de orgánulos se usaron los anticuerpos anti-Citocromo C como marcador de membrana mitocondrial interna; anti-TOM20 como marcador de membrana mitocondrial externa y, anti-GRP94 como marcador de retículo endoplásmico (RE).

Para la obtención de extractos enriquecidos en mitocondrias para la localización de RAB6B se utilizaron cuatro placas confluentes de 150 cm² de células SH-SY5Y. El pellet se resuspendió en 1 ml de tampón de

extracción de mitocondrias (10mM Tris HCl pH 7,4, 0,3M sacarosa, 1mM EDTA, 5mM DTT, inhibidor de proteasas 1x) y se pasó por el homogeneizador esmerilado de vidrio con émbolo tipo *Tight*, (*Wheaton*) en 3 ciclos de 10 pases con 10 segundos de descanso entre cada ciclo. Después, se centrifugó a 1000g y, el sobrenadante, se volvió a centrifugar a 13.000g para obtener el pellet de mitocondrias. El sobrenadante se concentró en tubos con filtros para concentrar proteínas (Millipore) y las mitocondrias se lavaron con el tampón de extracción. Finalmente, las fracciones se cargaron en un gel SDS-PAGE para su análisis.

Para la obtención de las membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) se siguió el procedimiento descrito por Wieckowski y colaboradores⁷⁴, utilizando un mínimo de 2 gramos de cerebro de ratón adulto (4 ratones).

6 Modelo de Silenciamiento por Interferencia de RNA (RNAi)

Se utilizó un modelo de inhibición de GDAP1 por RNAi desarrollado previamente en el laboratorio. Las células SH-SY5Y se transfectaron con el vector pKLO.1 (*MISSION® shRNA Plasmid DNA*, Sigma-Aldrich) que contenía secuencias complementarias para la formación de horquillas del gen *GDAP1* y secuencias no dirigidas para el control (pKLO-NT), con al menos 5 pares de bases no complementarias con el shRNA. Las transfecciones se llevaron a cabo usando SuperFect (Qiagen, Dusseldorf, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se crecieron en DMEM-F12 con 10% de FBS, 2mM de L-glutamina y 100mg/ml penicilina-estreptomina (Gibco, Invitrogen, Carlsband, CA) a 37°C con 5% CO₂ y 2 µg/ml de puomicina para mantener la selección.

Disponemos de tres líneas celulares para este modelo:

1. pKLO-NT: línea celular de SH-SY5Y transfectada con un RNAi no dirigido. Se utiliza como control.
2. G1: línea celular de SH-SY5Y transfectada con un RNAi dirigido a GDAP1. Posee una reducción de la expresión de GDAP1 de alrededor del 40% comparado con el control o con la línea original.
3. G4: línea celular de SH-SY5Y transfectada con un RNAi dirigido a GDAP1 diferente del anterior. Posee una reducción de la expresión de GDAP1 de alrededor del 60% comparado con el control o con la línea original.

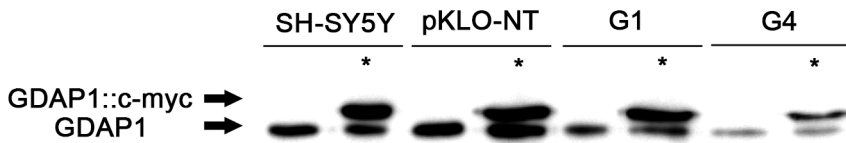


Figura 6. Expresión de GDAP1 en las diferentes líneas de SH-SY5Y. GDAP1 se refiere a la proteína en niveles basales. *, extracto de células transfectadas.

Para el mantenimiento de las líneas transfectadas con el RNAi para GDAP1 y de la línea control, se utiliza el mismo tipo de medio que para las células sin transfectar pero añadiendo al medio puromicina 2ug/ml. Los niveles de expresión de GDAP1 en estos clones se muestra en la figura 6.

i) Transfección de células SH-SY5Y

La transfección de este tipo celular se llevó a cabo usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se sembraron 50.000 células/cm² para extracción de

proteínas, o 25.000 células/cm² para inmunofluorescencias indirectas, y se dejaron 24 horas en el incubador. Para la transfección se utilizó 1ul de lipofectamina y 0,4ug de DNA por cm². Tras 6 horas, el medio se cambió y se dejó incubar 16 horas más. Las muestras se procesaron 24 ó 36 horas después de la transfección en función de si se procesaban para extracción de proteínas o inmunofluorescencia.

7 Microscopía de Fluorescencia

i) Experimentos de colocalización

Este tipo de experimentos se realizaron en células HeLa con aquellas proteínas que se habían encontrado que interaccionaban con GDAP1. Para ello, se sembraron sobre cubres de vidrio 15.000 células/cm² y se transfectaron según lo explicado anteriormente con las parejas de plásmidos correspondientes (pCMV-c-myc y pCMV-HA) . Tras 36 horas se fijaron con 4% de PFA durante 20 minutos y los cubres se lavaron varias veces con PBS.

Para la inmunofluorescencia, las células se permeabilizan con 0,5% de tritón X-100 en PBS durante 30 minutos, se bloquean con una solución de bloqueo (5% de leche desnatada, 10% de FBS, 0,5% de BSA y 0,1% de tritón X-100). Los anticuerpos primarios anti-c-myc y anti-HA se incubaron a una dilución de 1:200 durante toda la noche. Finalmente, se incubó durante 1 hora con los anticuerpos secundarios Alexa (Molecular Probes) conjugados con fluoróforos de emisión de fluorescencia a 488nm, 548nm ó 633nm a una concentración de 1:200 y, tras lavar con PBS, se montaron los cubres con Aqua Poli Mount (Polyscience Inc.).

Las preparaciones se observaron en el microscopio confocal Leica TCS SP Confocal System.

ii) Morfología mitocondrial

En el caso de células HeLa no transfectadas se procedió según lo explicado anteriormente, utilizando anticuerpo primario frente a la proteína TOM20. En el caso de células transfectadas se utilizó anticuerpo primario frente a la etiqueta c-myc y HA para comprobar la transfección, anti c-myc en el caso de la transfección con pCMV-GDAP1::c-myc y, TOM20 en el resto de casos en los que no se transfecta con una proteína mitocondrial.

Se seleccionaron 5 tipos diferentes de morfologías mitocondriales (tubular, fragmentada, mixta, vesicular y agregada) y se clasificaron las células en función del patrón que presentaban. Se contaron al menos 100 células por experimento en un total de 3 experimentos.

iii) Parámetros morfológicos mitocondriales. Interconectividad e Índice de elongación

Con el fin de obtener un valor que caracterice las diferentes morfologías mitocondriales, se analizaron las células siguiendo el procedimiento descrito por Dagda³².

Para las células HeLa se procedió según lo explicado anteriormente. Para las células SH-SY5Y se procedió del mismo modo excepto para la fijación de las células. Así, los cubres se fijan con una solución de PFA al 2% durante 10 minutos seguido de otra con PFA al 4% durante 10 minutos mas.

Utilizando el microscopio confocal, se tomaron imágenes representativas de células en las que se había marcado la mitocondria, bien con anti-c-myc porque se había transfectado con GDAP1 o TOM20 en el caso de células sin transfectar. Las imágenes se analizaron con el programa IMAGE J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) con un Macro desarrollado por Dagda y colaboradores³². Los parámetros obtenidos fueron Número de mitocondrias como objetos presentes en la imagen, Índice de Elongación como la inversa de la circularidad de los objetos e, Interconectividad Mitocondrial como el ratio entre el área y el perímetro de los objetos. Se analizaron al menos 100 células por experimento en un total de 3 experimentos.

iv) Movimiento mitocondrial

Para medir el efecto de GDAP1 en el movimiento mitocondrial, se utilizó el método descrito por Shprung¹⁰⁴. En el caso de las células SH-SY5Y que poseen reducción en los niveles de proteína GDAP1, se sembraron 25.000 células/cm² en placas con fondo de vidrio (IBIDI) y se marcaron las mitocondrias incubando las células durante 20 minutos con 400nM Mitotracker Deep Red. A continuación se cambió el medio y se mantuvo a las células 20 minutos mas para que introdujeran completamente la sonda antes de tomar las imágenes.

Con el microscopio confocal se tomaron imágenes de las mitocondrias con un lapso de tiempo (t) de 30 segundos entre imágenes, registrando en total 5 eventos en al menos 5 planos, con lo que se obtiene un total de 25 eventos de movimiento por experimento. El experimento fue replicado 3 veces.

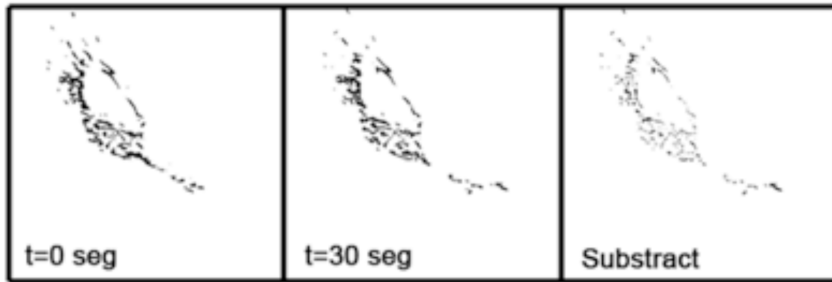


Figura 7. Análisis de Imagen. Análisis de Imagen para la cuantificación del movimiento mitocondrial.

En relación al efecto producido por la sobreexpresión de GDAP1 y diversas mutaciones, se sembraron 15.000 células/cm² de HeLa y, tras 24 horas se transfectaron según lo descrito anteriormente con los plásmidos pEGFP, de modo marcamos directamente las mitocondrias de las células que se han transfectado con GFP. Tras 36 horas se registraron las imágenes del mismo modo que lo realizado para SH-SY5Y.

Las imágenes tomadas se analizaron con el programa IMAGE J de modo que, después de convertirlas a imágenes binarias, a la imagen recogida a t=0+30 seg se le restó la imagen recogida a t=0. De este manera se obtiene una imagen resultante únicamente con los pixeles que han cambiado de posición que podemos relacionar con eventos de movimiento mitocondrial según los autores citados (Fig. 7).

v) Colocalización retículo endoplásmico-mitocondria

Para obtener un índice que nos indicara el grado de colocalización entre estos dos orgánulos se adaptó el procedimiento descrito por de Brito y Scorrano a la tecnología de la que disponemos. Así, tras fijar SH-SY5Y y

HeLa en cubres de vidrio según lo descrito anteriormente, se marcaron las mitocondria y el RE con el anticuerpo anti-citocromo c y anti-GRP94 respectivamente. Se tomó un plano representativo de las células y se procedió al análisis de imagen con el programa IMAGE J. Las imágenes se limitaron automáticamente en intensidad (*threshold*), se deconvolucionaron (Anexo 2) y se analizaron utilizando el plugin específico JACOP desarrollado por S. Bolte y F. P. Cordelieres (<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/track/jacop.html>)¹⁰⁵. Se analizaron al menos 30 células por experimento en un total de 3 experimentos.

8 Microscopía Electrónica

Los experimentos de microscopía electrónica se realizaron en el Servicio Central de Soporte a la Investigación y Experimentación (SCSIE) de la Universidad de Valencia y en el Hospital La Fe de Valencia en colaboración con el Dr. Jaime Renau-Piqueras.

Tras la transfección de células HeLa con pCMV-c-myc::GDAP1, estas se fijaron en tampón Karnovsky (0,5% glutaraldehido, 2,5% paraformaldehido) durante 2 horas. Seguidamente las células se centrifugan y el pellet se incluyó en agar, donde se lavó con 0,1M PBS y se postfijó en osmio al 2% durante 2 horas. Seguidamente, las células se lavaron en agua destilada y se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) y rehidratan con oxido de propileno para incluir finalmente en resina epoxi que se dejó polimerizar a 60° durante 48 horas. Finalmente, las muestras se cortaron con Ultracut Leica UC6 en secciones ultrafinas y se sedimentaron en rejillas de cobre. Las muestras se analizaron en el equipo JEOL 1010.

9 Medición de Calcio

Las medidas de Calcio en células SH-SY5Y se realizaron en el Centro de Biología Molecular Severo-Ochoa de Madrid, en el Laboratorio de Jorgina Satrustegui.

i) Medidas de calcio citosólico.

Las variaciones en el Ca^{2+} citosólico se midieron utilizando la sonda Fura-2 AM. Esta sonda posee unas características específicas para medir las variaciones en la concentración de este ion. La sonda Fura-2 AM tiene la capacidad de absorber luz a una longitud de onda (λ) de 340nm cuando no tiene Ca^{2+} unido. Por el contrario, cuando se une al ion, la sonda absorbe luz a una $\lambda = 380\text{nm}$. En ambos casos, el máximo de emisión es a $\lambda = 510\text{nm}$. El ratio entre $\lambda_{340}/\lambda_{380}$ en función del tiempo nos da una medida de la concentración del ion. Además, la sonda posee una K_d para el Ca^{2+} de 225nM, podemos conocer la concentración del ion en el citoplasma de la células¹⁰⁶.

Para marcar las células con la sonda Fura-2 AM se sedimentaron 100.000 células en cubres de vidrio y se incubó en una solución HCSS (Gibco) suplementado con 30mM de Glucosa, 0,06% de ácido plurónico y 5uM de Fura-2 AM (Molecular Probes) durante 30 minutos a 37°C. Después, las células se lavaron en medio HCSS con 30mM de glucosa y 2mM de CaCl_2 .

Los experimentos de Imaging de Ca^{2+} se realizaron según lo descrito por Ruiz¹⁰⁷ utilizando como movilizadores de Ca^{2+} 30mM de KCl, 5ug/ml de tapsigarguina y 200uM de ATP.

Se realizaron un total de 5 experimentos en que, por cada experimento, se midieron al menos el efecto en 20 células.

ii) Capacidad de carga en células permeabilizadas.

Los ensayos de capacidad de retención de Ca^{2+} se realizaron para descartar la disfunción mitocondrial en la captura de Ca^{2+} citosólico. El experimento se realizó según lo descrito por Traba y colaboradores¹⁰⁸. Brevemente, la misma cantidad de células se resuspendió en 125mM KCl, 2mM KPi , 1mM MgCl_2 , 20mM HEPES, pH 7,4. Las células se permeabilizan utilizando 80uM de digitonina, con lo que se rompe la membrana plasmática pero no las mitocondrias. La captura de calcio se midió fluorimetricamente a 30°C usando 0,1nM de la sonda *Calcium Green-5N*, 5nM de Succinato como fuente de electrones para el complejo II, 1uM de rotenona para inhibir el complejo I, 200uM de ADP para la fijación a ATP. El efecto del RE en la captura de Ca^{2+} se descartó usando Rojo Rutenio, droga que bloquea el uniportador de Ca^{2+} de la mitocondria, con lo que el efecto que se observe debe ser únicamente del RE.

10 Diferenciación de Células SH-SY5Y

La diferenciación de las células de neuroblastoma se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Gimenez-Cassina⁸².

Como marcadores de diferenciación se usó MAP-2, como marcador de dendritas, SNAP-25 para vesículas pre-sinápticas, Sinaptofisina como marcador de vesículas post-sinápticas, *cdc2/cdk1* como marcador de ciclo celular y TAU como marcador de formación de axones.

Las células diferenciadas se utilizaron para extracción de proteínas y análisis por western blot y, además, para análisis morfológico a nivel microscópico. En este caso, se cuantificó el nivel de fluorescencia para el marcador de diferenciación MAP-2.

Para comprobar el estado de la ruta PI3K/AKT, las células se indujeron con insulina 100nM según lo descrito por Vernia y colaboradores¹⁰⁹.

11 Estrés Oxidativo y Apoptosis

La susceptibilidad al estrés de retículo se realizó según lo descrito por Vernia¹¹⁰. Brevemente, las células de neuroblastoma se trataron con 1uM de taspigarguina y/o 100nM de bafilomicina A para inhibir la autofagia, y se mantuvieron en cultivo durante 18 horas. Al finalizar, se recogieron las células para extracción de proteínas o citometría.

Para la cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo se sembraron $1 \cdot 10^4$ células/cm² y se dejaron en el creciendo durante 48h, tras lo cual se indujo el tratamiento correspondiente. Al finalizar el tratamiento, las células se recogieron con tripsina conservando el medio inicial. Las células se pasaron por una aguja de 21G y se fijaron en 1 ml/ $5 \cdot 10^4$ células de Etanol al 70% en PBS durante al menos 24 horas a -20°C. Finalmente, las células se tiñeron 30 minutos a 37°C con Ioduro de Propidio 0,05 mg/ml en presencia de RNAasa 0,25 mg/ml y se pasaron por el citómetro para cuantificar el porcentaje de células apoptóticas.

RESULTADOS

CAPÍTULO I. BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE GDAP1

1 GDAP1 se localiza formando dímeros en la membrana mitocondrial externa, regulando la morfología y el movimiento mitocondrial.

GDAP1 es una proteína de membrana mitocondrial externa cuyas mutaciones producen varias formas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Diversos autores^{24, 25} han relacionado GDAP1 con procesos de dinámica mitocondrial ya que la sobreexpresión de GDAP1 provoca el fraccionamiento drástico de la red mitocondrial.

El análisis *in silico* de la estructura de la proteína GDAP1 reveló que es una proteína perteneciente a la familia de las glutation-S-transferasas (GST)²³ aunque sin actividad GST^{26, 111}. GDAP1 presenta dos dominios con similitud a las proteínas GST denominados GST-N y GST-C. Entre estos dominios se sitúa un dominio denominado $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop que no tienen similitud con ninguna estructura conocida. En el extremo Ct se encuentran una serie de residuos hidrofóbicos encargados de anclar la proteína a la membrana mitocondrial externa²⁷.

Muchas de las proteínas de membranas mitocondriales, se agrupan formando complejos y supercomplejos. Así por ejemplo, las proteínas de la cadena de transporte mitocondrial¹¹², las proteínas prohibitinas, relacionadas con procesos de envejecimiento¹¹³, etc. Por este motivo y, dado que los dominios GST son posibles dominios de dimerización²³ se planteó la posibilidad de la existencia de complejos formados por GDAP1 y alguna otra proteína. Para contestar esa pregunta realizamos la separación de complejos de la membrana mitocondrial externa mediante Blue-Native PAGE¹⁰². Esta técnica permite, en una primera dimensión, separar grandes complejos proteicos en función de su tamaño y, en una segunda dimensión, separar los componentes del complejo.

La separación en condiciones nativas de las proteínas de membrana mitocondrial de células SH-SY5Y revela que GDAP1, con un peso molecular de 42 KDa, migra a una distancia que corresponde aproximadamente a un complejo de 90 KDa (Fig. 8a), lo que sugiere que GDAP1 puede formar dímeros.

Muchas de las mutaciones descritas para *GDAP1* se encuentran localizadas en los dominios GST de la proteína. Dado que son estos los dominios que pueden dimerizar, nos preguntamos si estos cambios podrían estar alterando la formación de los complejos. Bajo esta premisa seleccionamos una serie de mutaciones diferentes en cuanto a su localización y su patrón de herencia mendeliana. En la figura 8b se muestra una representación de dichas mutaciones.

Para comprobar el efecto de las mutaciones en la formación de los dímeros, transfectamos células HeLa con diferentes construcciones con las diferentes mutaciones p.R120Q, p.R120W, p.T157P, p.R161H y p.R282C (Fig. 8c) y medimos la distancia entre estas proteínas y la ATPasa del complejo V de la cadena de transporte mitocondrial. El patrón de migración en condiciones nativas es variable en función del tipo de mutación. Así, las mutaciones presentes en los dominios GST migran a una distancia mayor que las presentes en el *loop*, por lo que es posible que dificulten la interacción de GDAP1 consigo misma o con otras proteínas.

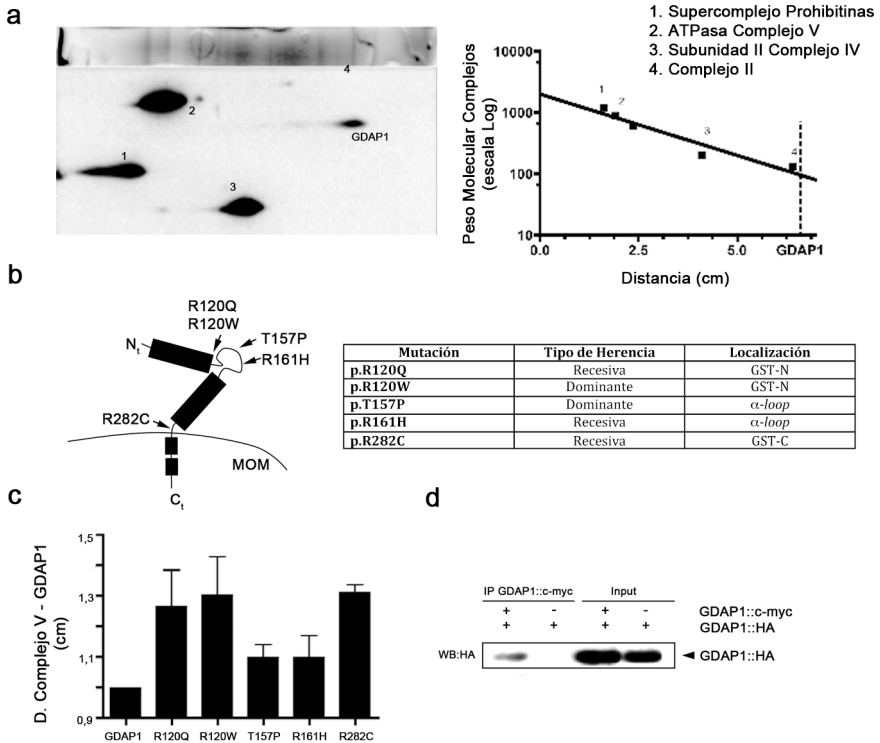


Figura 8. Organización estructural de GDAP1 en la membrana mitocondrial externa. (a) Electroforesis en condiciones nativas de extractos mitocondriales de células SH-SY5Y y estimación del tamaño del complejo. (b) Esquema de las mutaciones *missense* elegidas en donde se indica su localización en la estructura de la proteína. En la tabla adjunta se muestra tanto la localización como el patrón de herencia en el que se transmiten. (c) Distancias de GDAP1 y diferentes mutaciones *missense* al Complejo V de la cadena de transporte electrónico. (d) Co-IP de GDAP1::c-myc y GDAP1::HA.

Para confirmar la posible dimerización transfectamos células HeLa con dos construcciones de GDAP1 fusionadas con las etiquetas c-myc y HA respectivamente e inmunoprecipitamos la proteína con la etiqueta c-myc con el fin de detectar la proteína con HA. En la figura 8d se muestra el resultado en el que se confirma que ambas proteínas coinmunoprecipitan juntas por lo que, junto con la distancia de

migración en condiciones nativas y el análisis *in silico*, sugiere que GDAP1 puede formar dímeros en la membrana mitocondrial externa.

Para ver el efecto de GDAP1 en la morfología mitocondrial utilizamos un modelo celular de neuroblastoma humano, desarrollado en el laboratorio por M. Sanchez-Piris, en el que los niveles de GDAP1 están reducidos mediante silenciamiento por RNA de interferencia (Fig. 6). Con el objetivo de cuantificar de manera más objetiva la morfología mitocondrial utilizamos un análisis de imagen que nos permite la obtención de diferentes índices que nos dan un valor numérico que caracteriza las células en función del tipo de mitocondrias que posean.

La inhibición de GDAP1 tiene un resultado cuanto menos llamativo. Dado que la sobreexpresión de GDAP1 provoca la fragmentación de la red mitocondrial, cabría esperar que la inhibición produjera el efecto contrario. Al observar la red mitocondrial de las células SH-SY5Y y de la expresión de GDAP1 (Fig. 9a) obtenemos que la inhibición de GDAP1 no produce una disminución significativa del número de mitocondrias por células sino que se observa una tendencia al alza (Fig. 9b). Sin embargo, el rescate con GDAP1 en estos clones produce un aumento en el número de mitocondrias como ya se había descrito con la sobreexpresión en otros tipos celulares^{24, 25}. Por otra parte, el análisis de imagen nos proporcionó dos índices que reflejan el estado de la red mitocondrial, el índice de elongación y la interconectividad mitocondrial.

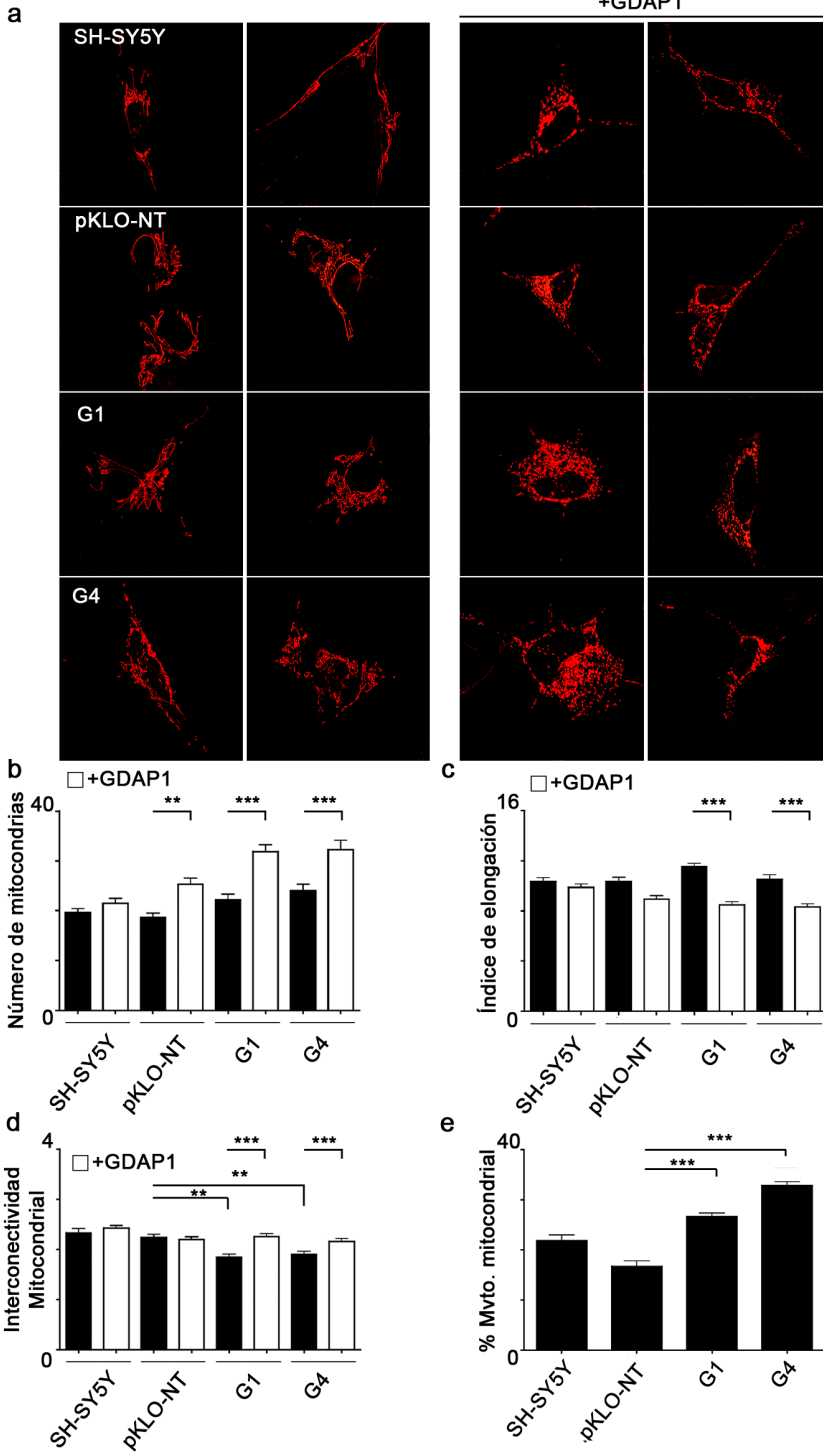


Figura 9. Efectos en la morfología mitocondrial por parte de GDAP1. (a) Imágenes de microscopía confocal en la que se ha marcado en rojo la proteína mitocondrial TOM20. (b) Número medio de mitocondrias por célula. n=30, 3 replicas. (c) Índice de elongación medio por célula. n=30, 3 replicas. (d) Interconectividad mitocondrial media por célula. n=30, 3 replicas. (e) Cuantificación del movimiento mitocondrial.

En el caso de el índice de elongación (Fig. 9c), no encontramos diferencias significativas para la inhibición aunque la expresión de GDAP1 si que produce un descenso significativo de este índice debido al efecto en la fisión mitocondrial.

El índice de interconectividad mitocondrial, nos da una idea de la relación de la red mitocondrial consigo misma. Así, la inhibición de GDAP1 provoca un descenso en las conexiones de esta red (Fig. 9d), es decir, nos encontramos ante una red más fragmentada que la original. La sobreexpresión de GDAP1 en estas líneas permite recuperar el estado original aumentando el índice de interconectividad.

Tanto el aumento en el índice de elongación como de la interconectividad al sobreexpresar GDAP1 sugiere que la red de mitocondrias tiende a mantenerse mas interconectada.

Resulta confuso entender como una red más fragmentada puede estar a la vez más interconectada. El índice de interconectividad está representado como el ratio área/perímetro de los objetos de una imagen. De este modo, las mitocondrias fragmentadas se corresponden con un gran número de objetos, cada uno de ellos con un área pequeña y un perímetro relativo grande, lo que produce índices de interconectividad

bajos. Por el contrario, la fragmentación más agregación de la red se corresponde con un área mayor en un perímetro más reducido lo que produce un aumento del índice de interconectividad debido, fundamentalmente, a la agregación perinuclear de las mitocondrias. Esta tendencia a la agregación perinuclear explicaría que la sobreexpresión de *GDAP1* produzca una mayor interconectividad.

Como hemos comentado en la introducción los procesos de dinámica mitocondrial y movimiento de mitocondrias están muy relacionados. Por este motivo, el silenciamiento de *GDAP1* podría alterar la motilidad mitocondrial. La cuantificación de la motilidad mitocondrial nos muestra como la inhibición de *GDAP1* provoca un aumento significativo de la motilidad mitocondrial en comparación a las células normales (Fig. 9e) lo que podría estar indicando una desregulación del proceso.

2 *GDAP1* interacciona principalmente con proteínas relacionadas con el citoesqueleto y proteínas de membrana.

Tanto la dinámica mitocondrial como el movimiento de mitocondrias son procesos altamente regulados y en el que participan muchas proteínas. La especificidad y regulación de estos procesos es un punto crítico en gran variedad de células pero sobre todo en células neuronales donde, además de requerir gran cantidad de energía aportada por las mitocondrias, éstas deben viajar largas distancias a través de los axones y localizarse en aquellos puntos en donde se necesiten, como por ejemplo en dendritas, conos de crecimiento axónico, sinapsis, etc. Una manera de conocer la función de una proteína es determinar con que proteínas interacciona de modo que se la pueda situar en un proceso biológico

determinado. Bajo esta premisa realizamos un análisis de dos híbridos en levadura enfrentado GDAP1 contra una librería de cDNA de cerebro humano.

Este análisis ha revelado que GDAP1 interacciona con un gran número de proteínas con diversas funciones. Entre estas destacan proteínas del citoesqueleto o relacionadas con éste, así como reguladores o transductores de señales del exterior.

Tabla 3. Relación de las proteínas más características encontradas en el ensayo de Doble Híbrido empleando como cebo la proteína GDAP1 frente a una genoteca de cDNA de cerebro humano.

PROTEÍNA	FUNCIÓN	Nº de Clones
WASP	Modificador del citoesqueleto de actina	1
CENTB2	Regulador de transporte vesicular	1
GABARAP/	Transductor de señales inhibitorias.	13
ATG8	Receptor GABA	
	Transporte anterógrado vesicular y	
Caytaxina	mitocondria	3
	Regulador del citoesqueleto. Crecimiento	
Plexina	celular, migración de cono axónico, etc.	1
INA	Filamento Intermedio α -internexina	1
	Proteína de membrana. Formación de	
ADCY8	AMPc	2
Homeobox	Desarrollo del Sistema Nervioso Central	2
Protein ARX		

RAB6B	Transporte retrogrado Golgi-ER	5
	Componente mayoritario de	
TUBB	microtúbulos	1
	Proteína dependiente de Ca ²⁺ .	
	Reguladora de forma Golgi-ER-	
NCUB1	Citoesqueleto	1
PIKFYVE2	Regulador del trafico vesicular	3
	Desarrollo de Neuritas. Proteína de	
NFASC	membrana	1
	Proteína de membrana ER. Función	
TMEM106C	desconocida.	1
GABBR1	Receptor de GABA	2
	Proteína que promueve proliferación	
FAM172A	celular y bloquea apoptosis	1
	Proteína de membrana de función	
C20ORF3	desconocida	8
	Proteína de membrana. Transducción de	
ANKS4B	señal	1
	Proteína G implicada en formación y	
BAI3	mantenimiento de dendritas	1
	Proteína de membrana relacionada con el	
GGT2	metabolismo de Glutation	1

Se han analizado entre 200.000 y 250.000 clones independientes de los cuales se detectaron como positivos primarios 310 clones. De éstos, se

han extraído y secuenciado 162 clones. Los clones más interesantes se encuentran recogidos en la Tabla 3. Además, también se han encontrado *Contigs*, ORFs o fragmentos genómicos que, a día de hoy, se desconoce qué codifican.

De entre las proteínas encontradas destacan la proteína RAB6B ya que, pertenece a un tipo de proteínas que ya han sido implicadas en otras variantes de Charcot-Marie-Tooth como RAB7¹¹⁴ o RAB11¹¹⁵; la proteína *PIKfyve*, enzima encargada de un paso en una ruta de señalización cuya reacción inversa está catalizada por otra enzima, FIG4, cuyas mutaciones provocan CMT¹¹⁶; la proteína caytaxina, cuyas mutaciones provocan un tipo raro de ataxia denominada ataxia Cayman¹¹⁷ y, además relacionada con procesos de transporte mitocondrial¹¹⁸ y, finalmente, la proteína β -tubulina como componente mayoritario de microtúbulos.

Dado que el sistema de doble híbrido no representa un método completamente fiable para la búsqueda de interacciones proteicas, se necesita de otro método que confirme las interacciones encontradas. Se procedió, entonces, a realizar experimentos de coimmunoprecipitación de modo que se fueron seleccionando proteínas en función del número de veces que aparecieran como positivos, descartando los falsos positivos típicos de este tipo de ensayo.

De este modo, se ha confirmado la interacción para la proteína RAB6B (Fig. 10a); la proteína β -tubulina (Fig. 10b); la proteína caytaxina (Fig. 10c) y, el extremo Ct de la proteína *PIKfyve* (Fig. 10d).

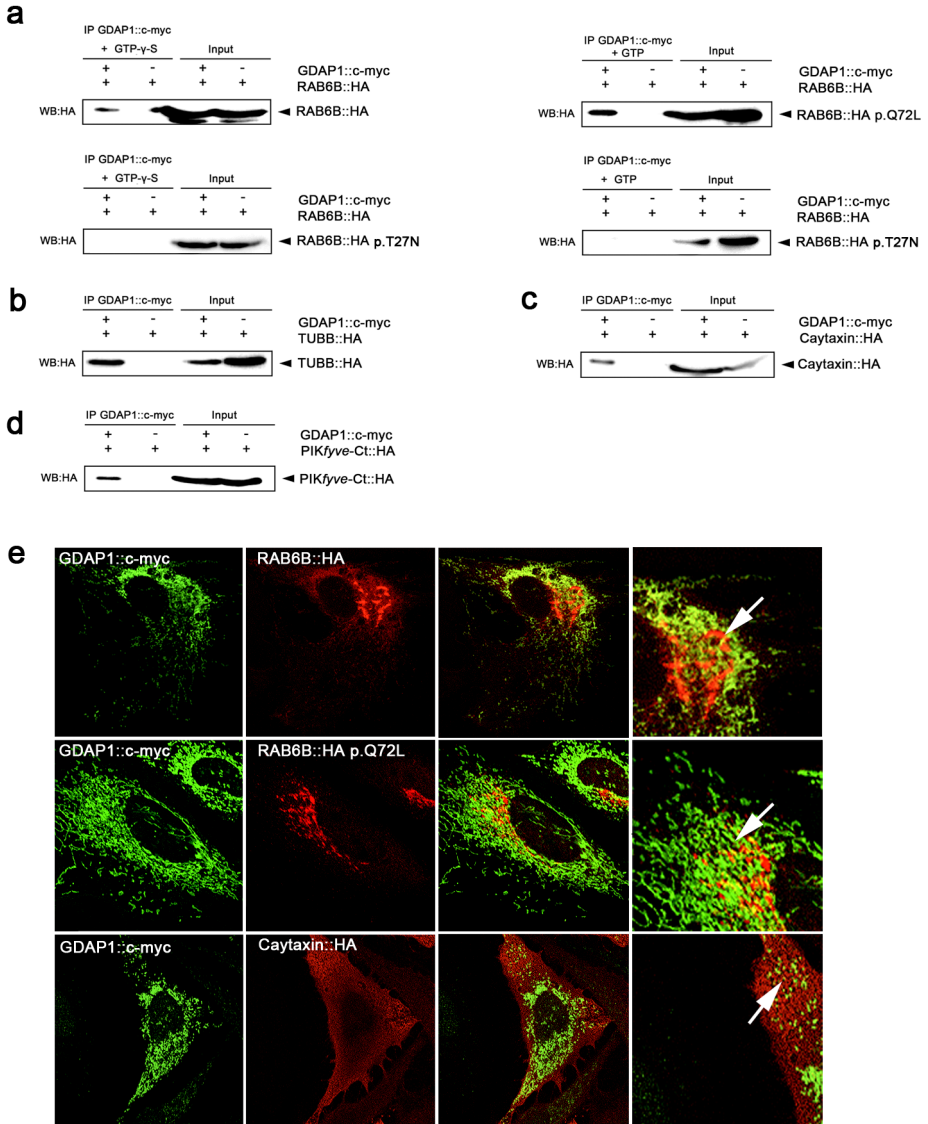


Figura 10. Confirmación de las interacciones encontradas por doble híbrido. (a) coIP de GDAP1::c-myc junto con TUBB::HA. (b) coIP de GDAP1::c-myc junto con RAB6B::HA con GTP- γ -S, RAB6B p.Q72L::HA con GTP RAB6B p.T27N con GTP y GTP- γ -S (c) coIP de GDAP1::c-myc junto con Caytaxina::HA. (d) coIP de GDAP1::c-myc con el extremo Ct de la proteína PIKfyve. (e) Imágenes de microscopía confocal en la que se observa colocalización parcial entre las proteínas indicadas (flechas)

RAB6B es una proteína que depende de GTP para realizar su función. Por este motivo y, dado que la coimmunoprecipitación con GDAP1 no era posible en las mismas condiciones que el resto de proteínas, analizamos dos proteínas mutantes que afectan la actividad de la proteína. La mutación p.Q72L evita que RAB6B pueda hidrolizar el GTP unido de modo que la proteína permanece constitutivamente activa. Por otro lado, la mutación p.T27N imposibilita la unión de GTP, evitando la activación de la proteína. De este modo, al añadir una variante de GTP que no se puede hidrolizar, GTP γ S, observamos que RAB6B coimmunoprecipita con GDAP1. A su vez, RAB6B^{p.Q72L}, activo constitutivamente, es capaz de coimmunoprecipitar con GDAP1 en presencia de GTP. Por el contrario, el mutante inactivo, RAB6B^{p.T27N} no puede coimmunoprecipitar con GDAP1 incluso añadiendo cualquiera de los dos compuestos (Fig. 10b). Estos resultados indican que la interacción de RAB6B con GDAP1 es dependiente de GTP.

En el caso de GABARAP, aun siendo la proteína con mayor número de clones interactores, no se ha podido confirmar la interacción. Tampoco para el filamento intermedio α -internexina y la proteína TMEM106C.

Además, se confirmaron por medio de microscopia confocal puntos de colocación entre las mitocondrias expresando GDAP1 y las proteínas RAB6B y caytaxina (Fig. 10e).

La proteína RAB6B pertenece a la familia de las proteínas de unión a GTP RAB/Ypt, de las que se conocen mas de 30 proteínas¹¹⁹. Son

proteínas implicadas en el tráfico vesicular, fusión de membranas, e intermediarios entre motores moleculares. RAB6B se ha localizado en el compartimento entre el aparato de Golgi y el RE¹²⁰ en donde funcionaría en el transporte retrogrado de vesículas desde la red trans del aparato de Golgi hasta la cara externa del RE interactuando con proteínas de la familia de las dineínas¹²¹.

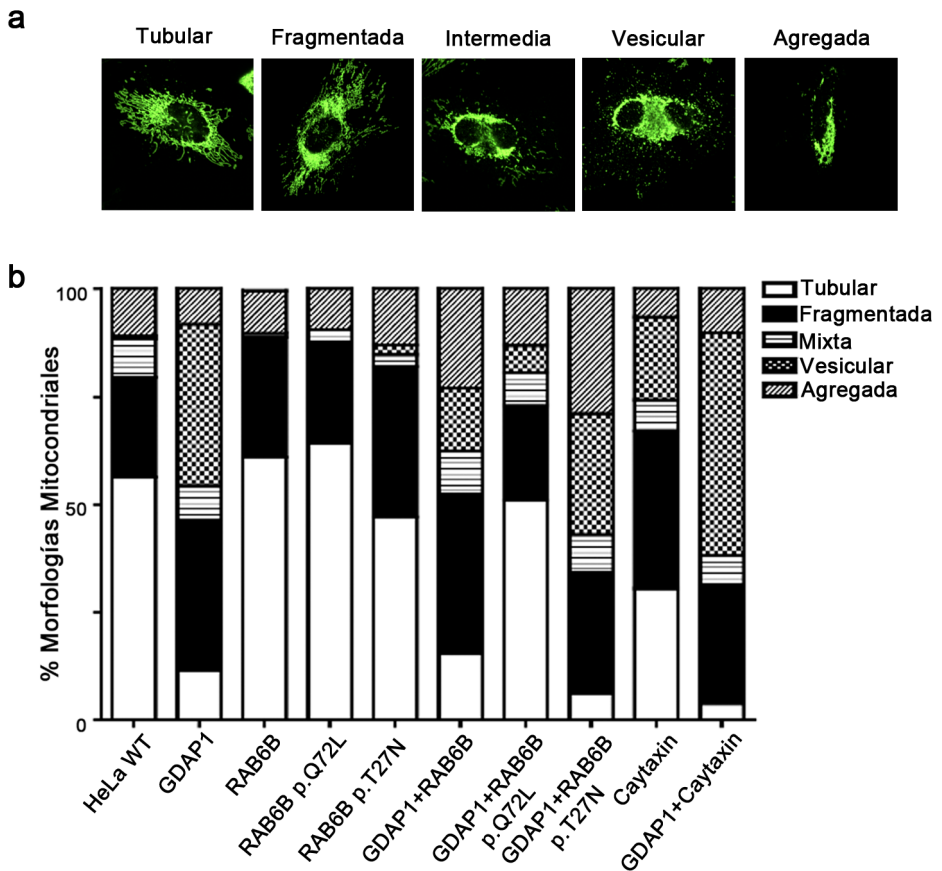


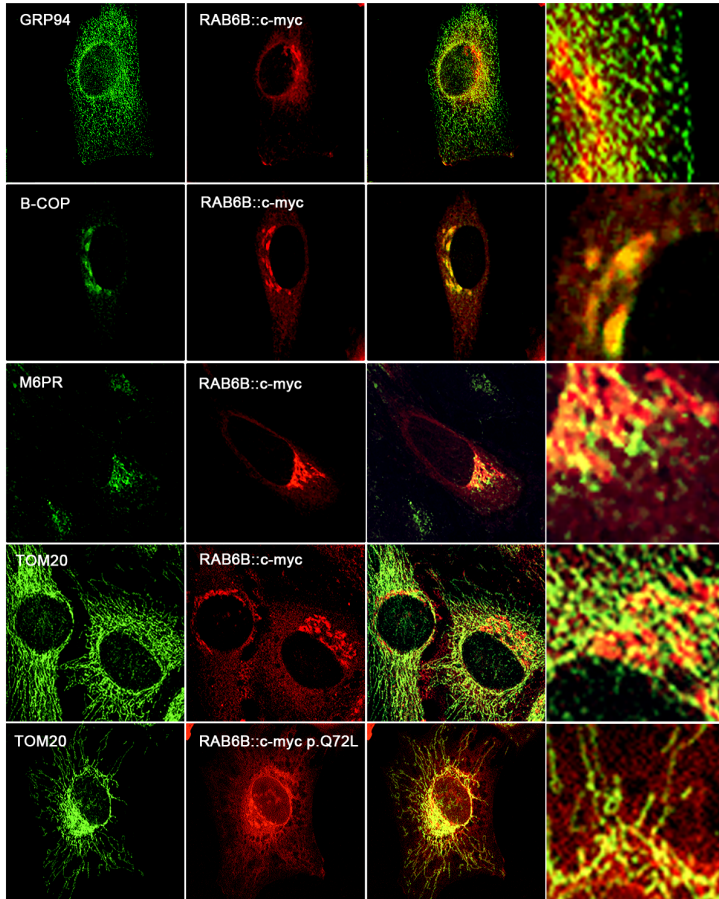
Figura 11. Variación en las morfologías mitocondriales por sobreexpresión de diferentes proteínas. (a) Patrones mitocondriales más comunes. (b) Cuantificación de las diferentes morfologías encontradas tras sobreexpresar las proteínas indicadas. WT, no transfectado.

Por otra parte, la proteína caytaxina es una proteína pequeña que funciona de adaptador entre vesículas y transporte anterógrado interactuando con proteínas de la familia de las kinesinas¹¹⁸. Esta proteína además, interactúa también con mitocondrias y esta implicada en su transporte hacia la zona distal de las neuronas¹²².

A la vista de nuestros resultados y visto que la expresión de GDAP1 modifica la morfología mitocondrial, nos planteamos la posibilidad de que estas dos proteínas pudieran estar guiando el proceso por el cual funciona GDAP1. Así, podemos sobreexpresar diferentes proteínas y clasificar las células en función del patrón mitocondrial que posean (Fig. 11a). De este modo, al sobreexpresar las dos proteínas con o sin GDAP1 observamos cambios en la morfología mitocondrial (Fig. 11b). Por ejemplo, la expresión de RAB6B o sus variantes no produce cambios en la morfología mitocondrial. Sin embargo, si sobreexpresamos GDAP1 junto con la forma activa de RAB6B se observa que se revierte el fenotipo que se obtiene al sobreexpresar únicamente GDAP1, tendiendo hacia unos patrones de morfología más tubular, similar a los patrones observados en las células sin transfectar. Los otros dos mutantes de RAB6B no producen cambios significativos lo que está de acuerdo con lo expuesto anteriormente en cuanto a la dependencia de GTP.

Por otra parte, la proteína caytaxina altera la morfología por ella misma sin necesidad de GDAP1 aunque los patrones de mitocondrias fisionadas se ven aumentados si se expresan las dos proteínas.

a



b

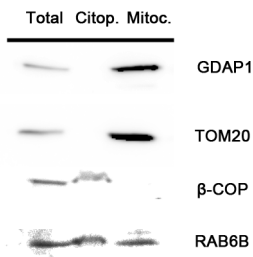


Figura 12. Localización subcelular de la proteína RAB6B. (a) Imágenes de microscopía confocal con la sobreexpresión de la proteína RAB6B colocalizando con marcadores endógenos de RE (GRP94), *cis*-Golgi (B-COP), *trans*-Golgi (M6PR) y Mitochondria (TOM20). (b) Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial.

Dado que nadie hasta ahora había relacionado RAB6B con procesos mitocondriales, pensamos en volver a localizar esta proteína para observar si la encontrábamos en lugares distintos a los descritos. De este modo, hicimos experimentos de colocalización de RAB6B frente al RE (GRP94), red *cis*-Golgi (β -COP), red *trans*-Golgi (M6PR) y GDAP1 o mitocondria (TOM20) (Fig. 12a). Como se observa, RAB6B colocaliza con la red *cis*-Golgi y de forma parcial con RE, *trans*-Golgi y GDAP1. RAB6B sólo colocaliza con mitocondria cuando se expresa la forma activa p.Q72L. Para confirmar estos resultados realizamos un centrifugación diferencial de células SH-SY5Y de modo que obtuviéramos una fracción enriquecida en mitocondria y una fracción citosólica junto con membranas ligeras (Fig. 12b). Así, confirmamos que RAB6B se encuentra junto con la fracción mitocondrial además de estar en la fracción citosólica, así que, además de en el aparato de Golgi, también se encuentra asociada a mitocondrias.

3 GDAP1 condiciona la colocalización entre la mitocondria y el retículo endoplásmico.

La proteína mitofusina 2 (MFN2) es una proteína presente principalmente en mitocondria^{46, 123} y, en menor medida en retículo endoplásmico⁴⁸. Las mutaciones en MFN2 provocan la forma más común de Charcot-Marie-Tooth tipo 2, además de estar implicada en otros procesos como la diabetes¹²⁴. MFN2 se relacionó en un momento con procesos de fusión mitocondrial pero, recientemente, de Brito y Scorrano descubrieron su implicación en la relación de la mitocondria con el retículo endoplásmico. De este modo, se puso de manifiesto la

relación estrecha entre la mitocondria y la homeostasis del Ca^{2+} y su implicación en la fisiopatología de una enfermedad neurodegenerativa.

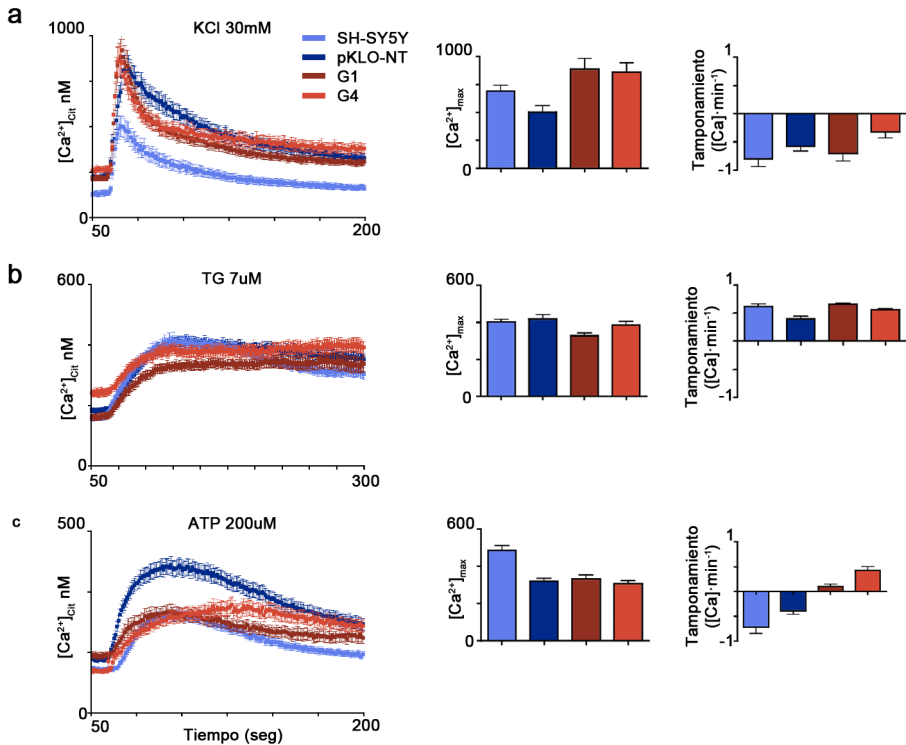


Figura 13. Homeostasis de Ca^{2+} . Inducción y cuantificación de la dinámica de calcio con la adición de (a) KCl, (b) tapsigarguina y (c) ATP.

En base a las proteínas interactoras encontradas y a los resultados previos, pensamos que los defectos en GDAP1 podrían afectar a la relación de la mitocondria con otros orgánulos e incluso, con otras mitocondrias. Los experimentos de homeostasis del Ca^{2+} nos aportan un parámetro fisiológico muy importante en muchos procesos celulares.

Para cuantificarlo utilizamos la sonda Fura-2 AM con inducción de calcio por KCl, tapsigarguina y ATP (Figura 13).

La inducción de células de neuroblastoma con KCl provoca la apertura de canales dependientes de voltaje presentes en la membrana plasmática^{125, 126}. El Ca^{2+} del medio extracelular entra en la célula y es rápidamente captado por el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Al producir esta inducción en los clones de SH-SY5Y, observamos un aumento rápido de Ca^{2+} en todos ellos y el tamponamiento posterior. Las líneas silenciadas para GDAP1 se comportan de una manera similar a la línea control mientras que, la línea *wild type*, tiene un pico menor.

Por otro lado, con la inducción con tapsigarguina, droga que bloquea de forma eficiente los canales de captura de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (SERCA)¹²⁷, se produce el vaciado del RE y el aumento del ion en el citoplasma. Al aplicar esta droga en los clones de SH-SY5Y observamos un aumento sostenido de la concentración de Ca^{2+} seguido de ligeras diferencias en cuanto al tamponamiento.

Finalmente, la adición de ATP activa la cascada de señalización de la ruta PLC γ que conlleva la activación de los receptores de rianodina (RyR) y de los IP₃R presentes en el RE¹²⁸. La apertura de estos canales provoca la salida de Ca^{2+} dirigida hacia el uniportador de la mitocondria. Al aplicar ATP a las células, observamos el aumento rápido del ion en el citoplasma. El tamponamiento posterior es producido por la mitocondria. En la línea control se produce un aumento de Ca^{2+} similar al de los dos

clones. Sin embargo, al cuantificar el tamponamiento de Ca^{2+} se observa un defecto importante para los clones deficientes en GDAP1.

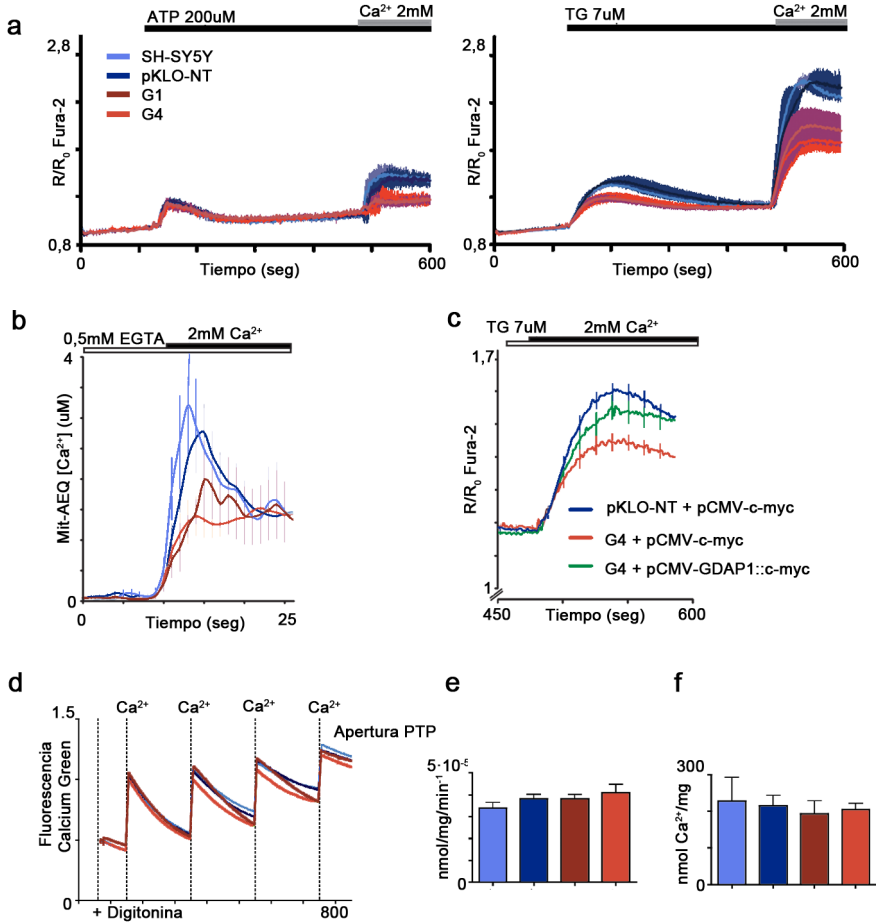


Figura 14. Homeostasis de Ca^{2+} en medio libre de calcio y capacidad de carga. (a) Variaciones en calcio citosólico y readmisión por SOCE con inducción por ATP (izquierda) y tapsigarguina (derecha). (b) Captación de Ca^{2+} por la mitocondria tras el SOCE con Mit-GEM-GECO1 (izquierda) y aequorina mitocondrial (derecha). (c) Rescate de la readmisión de calcio por SOCE. (d) Captación de calcio en mitocondrias aisladas. (e) Velocidad de captura de Ca^{2+} por la mitocondria. (f) Capacidad de carga de calcio.

Con los resultados obtenidos no podemos asegurar un defecto en la homeostasis de calcio producida por una mala relación de la mitocondria con el RE. Sin embargo, los diferentes inductores producen resultados llamativos. Las diferencias en los picos máximos de calcio pueden estar indicando diferencias en cuanto a la concentración de calcio dentro del RE.

En colaboración con el grupo de Javier Álvarez en la Universidad de Valladolid y Jorgina Satrustegui en el CBMSO de Madrid, se realizaron mediciones de la concentración de Ca^{2+} en el RE utilizando las proteínas aequorinas y no se encontraron diferencias sustanciales, por lo que las diferencias en los picos deberían estar indicando otro problema asociado.

La inducción de los movimientos de Ca^{2+} provoca el vaciado del RE que activa la entrada de Ca^{2+} a través de canales de membrana de baja conductancia que son regulados por los niveles de Ca^{2+} almacenado en el RE, un proceso conocido como *Store-operated Ca^{2+} entry* (SOCE)¹²⁹. Para conocer la contribución de los depósitos de Ca^{2+} celulares a través del SOCE, en colaboración con el grupo de Jorgina Satrustegui en el CBMSO, se realizaron los mismos experimentos en medio libre de Ca^{2+} , donde solo el calcio almacenado en el RE contribuye a la señal.

Como se muestra en la figura 14, las curvas obtenidas con la inducción de ATP (Fig. 14a) son prácticamente idénticas en todos los casos. La inducción con tapsigarguina sí que produce unos picos menores que podrían indicar diferencias en la concentración de calcio del RE, aunque esto ya se ha demostrado que no es así con los experimentos de

aequorinas. Por otro lado, la readmisión de calcio revela un drástico descenso en el SOCE en los clones deficientes para GDAP1. Estos resultados indican que las diferencias en los picos y el tamponamiento que se observan en los experimentos con calcio son posiblemente debidos a un descenso en la actividad del SOCE, lo que estaría produciendo las diferencias en la dinámica de las curvas mostradas en la figura 13.

Para que el mecanismo del SOCE sea eficiente se requiere que la mitocondria se encuentre cerca de los microdominios de calcio de modo que pueda captarlo y evitar así la inhibición de los canales CRAC y la sobrecarga del RE. Cabe preguntarse entonces si el defecto en la homeostasis de calcio es debido a algún defecto en la capacidad de la mitocondria para captar este ion. Para comprobarlo se transfectaron las células con aequorina dirigida a mitocondria. Como se ve en la figura 14b, la entrada de calcio a la mitocondria tras el SOCE está disminuida en los clones deficientes para GDAP1, con lo que se deduce que la inhibición del mecanismo del SOCE es producido por el aumento en la concentración local de Ca^{2+} que produce la inhibición de los canales CRAC. Para demostrar que la reducción del SOCE es producida por la disminución de los niveles de GDAP1, se transfectó el clon G4 con el plásmido pCMV-GDAP1::c-myc. Como se ve en la figura 14c, el SOCE no se ve afectado ni en la línea control ni en el clon G4 al transfectar con el vector vacío. Sin embargo, el SOCE se recupera en el clon G4 al recuperar los niveles de GDAP1.

Para conocer la capacidad de la mitocondria *per se* de captar calcio se realizaron experimentos en células permeabilizadas con la sonda *Calcium Green*¹³⁰, cuya fluorescencia aumenta en función de la cantidad de calcio que haya presente en el medio. Así, la adición de pulsos de CaCl_2 provoca un rápido aumento de la fluorescencia que va decreciendo progresivamente mientras las mitocondrias van captando el calcio (Fig. 14d). Tras la adición de varios pulsos de calcio se produce la apertura del Poro de Transición (PTP) que provoca la salida de Ca^{2+} por sobrecarga de la mitocondria. De este modo, al conocer la cantidad de moles adicionada en cada pulso y, sumando todos los sectores hasta la apertura del poro, podemos conocer la capacidad de carga de calcio de las mitocondrias (Fig. 14e) y, calculando la pendiente durante la captura tras la primera adición de CaCl_2 , podemos saber la velocidad de captura (Fig. 14f). Finalmente, para descartar el efecto del RE en la captura de calcio realizamos el mismo experimento en presencia de Rojo Rutenio sin observar ningún efecto, por lo que concluimos que el efecto observado es únicamente dependiente de la mitocondria. Para estos parámetros no encontramos diferencias significativas entre los clones.

En resumen, el descenso en los niveles de proteína GDAP1 en los clones RNAi de SH-SY5Y produce un defecto en la dinámica de calcio que no es debido al mal funcionamiento de la mitocondria *per se*, si no a algún fenómeno extrínseco a este orgánulo.

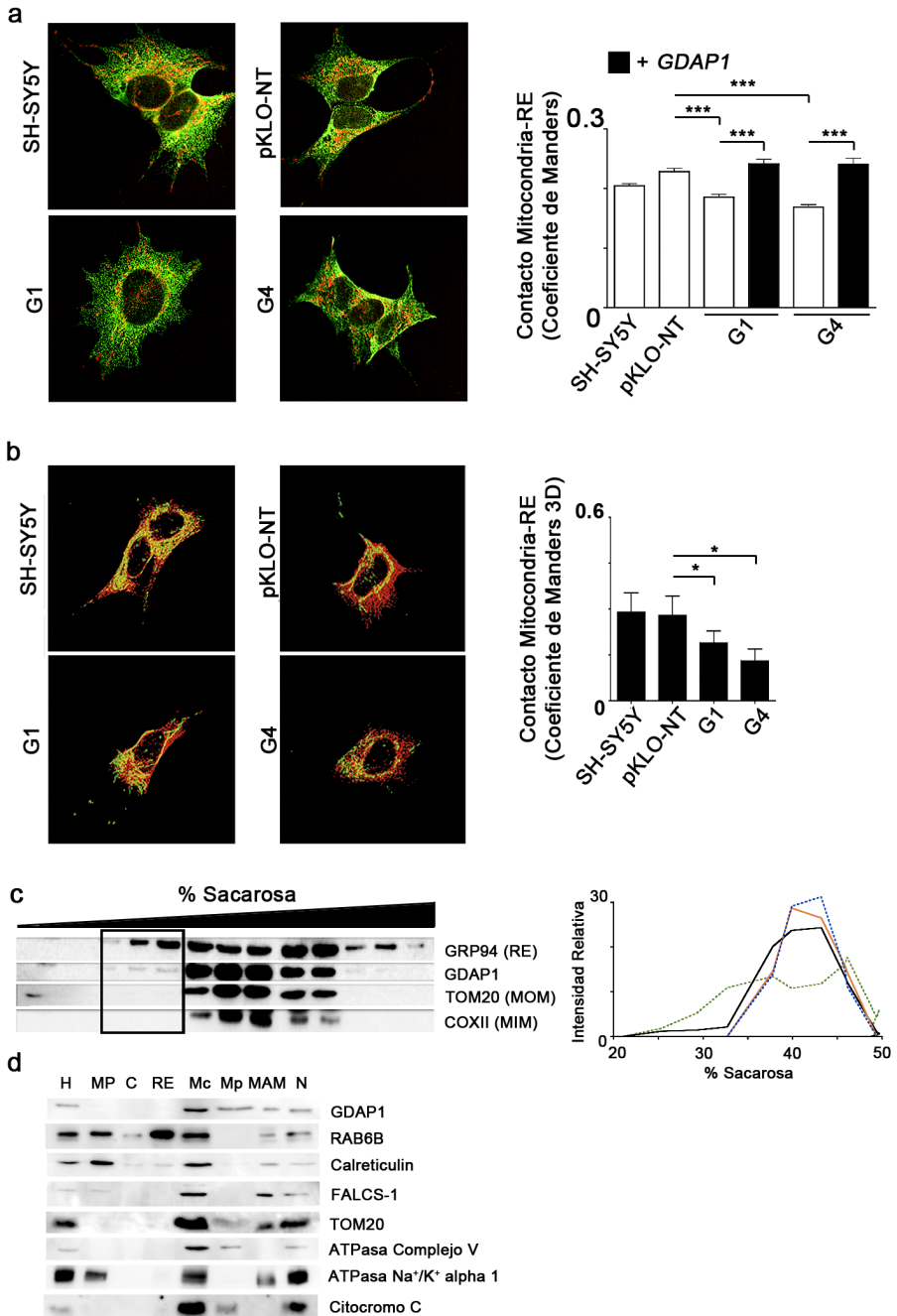


Figura 15. Implicación de GDAP1 en los relación mitocondria-RE. (a) Imágenes de microscopia confocal en las que se ha marcado en verde GRP94 (RE) y, en rojo, TOM20 (mitocondria) y cuantificación de los contactos mitocondria-RE en células de neuroblastoma y RNAi. *** $p < 0,01$. (b)

Reconstrucción tridimensional de células transfectadas con marcadores rojo para el RE y verde para la mitocondria cuantificación de la colocalización. * $p < 0,05$ (c) Fraccionamiento subcelular de extractos de células SH-SY5Y. GRP94, retículo endoplásmico; TOM20, membrana mitocondrial externa; COXII, membrana mitocondrial interna. (d) Fraccionamiento subcelular para la obtención de membranas asociadas a mitocondria (MAMs). H, lisado; MP, membrana plasmática; C, citoplasma; RE, retículo endoplásmico y aparato de Golgi; Mc, mitocondria; Mp, mitocondria pura; MAM, membranas asociadas a mitocondria; N, núcleos y células sin lisar.

Dada la relación de GDAP1 con proteínas del citoesqueleto y la implicación de MFN2 en el SOCE³⁶ y en los contactos entre el RE y la mitocondria⁴⁸, nos planteamos la posibilidad de que el defecto que observamos en la dinámica de calcio fuera debido a una alteración en la relación entre estos dos orgánulos. De manera numérica, se puede estimar la relación entre estos utilizando el índice de Manders¹⁰⁵ que nos indica el nivel de colocalización entre dos proteínas marcadas.

De este modo, para los clones de SH-SY5Y, marcamos la proteína GRP94, residente del RE, y la proteína citocromo c con dos fluoróforos diferentes (Fig. 15a). El análisis realizado muestra una reducción de la colocalización entre los dos orgánulos que es recuperado al expresar GDAP1 en los clones silenciados.

Este experimento se confirmó en el laboratorio de Luca Scorrano en Ginebra, Suiza, transfectando las células con proteínas fluorescentes marcando el RE y la mitocondria. A partir de las imágenes obtenidas se realizaron reconstrucciones tridimensionales de las células y se volvió a calcular el índice de Manders, confirmándose la reducción de la colocalización entre los dos orgánulos (Fig. 15b)

El contacto entre el retículo endoplásmico y la mitocondria se da en unas zonas específicas denominadas MAMs (*Mitochondrial Associated Membranes*). Es en estas zonas en donde se realizan los intercambios de Ca^{2+} a través de microdominios o *hot spots*. De Brito y Scorrano⁴⁸ demostraron que MFN2 se encuentra aumentada en estas zonas de contacto en ambos orgánulos. Con el objetivo de conocer si para GDAP1 ocurre algo similar y poder englobar dos procesos como fisión y fusión mitocondrial en un entorno similar, realizamos una separación de orgánulos en gradiente de sacarosa (Fig. 15c). Los diferentes orgánulos se separan en el gradiente en función de su densidad de modo que, por ejemplo, la mitocondria queda repartida entre una densidad de 35-50% de sacarosa y, el RE, de manera mas extensa pero sobretodo entre el 25-50% de sacarosa. Al probar para la proteína GDAP1 se observa que un pequeño porcentaje (5-10%) se localiza en fracciones no mitocondriales. Posteriormente confirmamos la presencia de GDAP1 y RAB6B en membranas asociadas a mitocondria (Fig. 15d). Como se observa en la figura, GDAP1 localiza en mitocondria cruda (Mc), en mitocondria pura sin membranas asociadas (Mp) y en MAMs. Por el contrario, RAB6B localiza en las membranas ligeras del aparato de Golgi y RE, mitocondrias cruda (Mc) y MAMs. De la presencia de RAB6B asociado a mitocondria ya se abordó en este trabajo en apartados anteriores (Fig. 12b). Como marcadores específicos de MAMs hemos utilizado calreticulina, proteína que une calcio, y FALCS-1, transportador de ácidos grasos de cadena larga, moléculas que se transfieren del RE a la mitocondria a través de las MAMs. La presencia de algunos marcadores como RAB6B o calreticulina en membrana plasmática o ATPasa Na^+/K^+

alpha 1 en MAMs puede estar indicando que las MAMs pueden no ser exclusivas de contactos mitocondria-RE y podría tratarse de membranas asociadas a otros orgánulos e implicadas en la relación entre ellos.

4 El efecto de mutaciones patológicas de GDAP1 es variable y se relaciona en parte con el patrón mendeliano de herencia.

La enfermedad de CMT producida por mutaciones en GDAP1 presenta la característica de que existe variabilidad en su patrón mendeliano de herencia. La mayoría de mutaciones *missense* encontradas se transmiten con un patrón recesivo aunque se han encontrado un grupo de mutaciones con un patrón claramente dominante^{38, 131, 132}.

Hasta el momento solamente Niemann y colaboradores²⁸ han relacionado diferencias en la dinámica mitocondrial en función del tipo de herencia de las mutaciones de GDAP1. Así, estos autores afirman que, mutaciones dominantes provocan defectos en fusión mitocondrial y acumulación de daño por estrés oxidativo. Por el contrario, las mutaciones recesivas estarían provocando defectos en fisión mitocondrial.

Para conocer el efecto de diferentes mutaciones en los parámetros medidos en este trabajo hemos utilizado dos mutaciones con herencia dominante (p.R120W y p.T157P) y tres de herencia recesiva (p.R120Q, p.R161H y p.R282C).

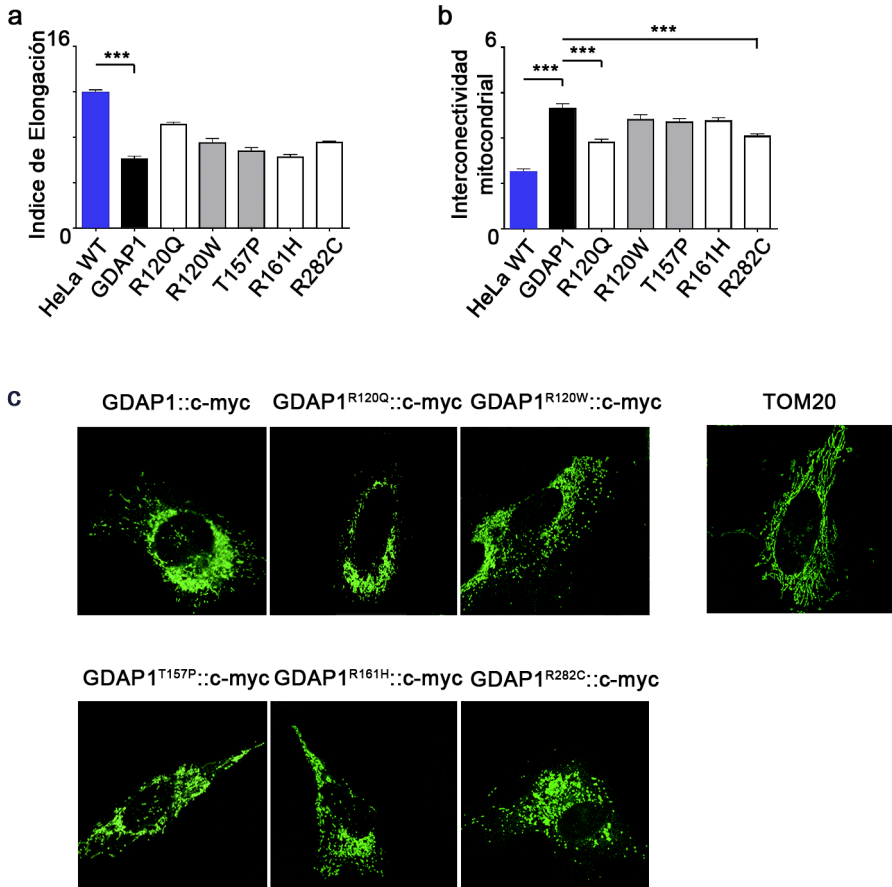


Figura 16. Morfología mitocondrial en células HeLa. (a) Índice de Elongación promedio de la red mitocondrial. *** $p < 0,001$. (b) Interconectividad mitocondrial promedio de la red mitocondrial. *** $p < 0,001$. (c) Patrón mitocondrial representativo al expresar las construcciones indicadas. TOM20 es un marcador mitocondrial utilizado para marcar las mitocondrias en células no transfectadas.

En nuestro modelo, con la expresión de GDAP1 en células HeLa y de las diferentes mutaciones *missense*, no podemos determinar ningún tipo de patrón característico atribuible al tipo de herencia de las diferentes mutaciones. Así, la expresión en estas células de GDAP1 produce un descenso en el índice de elongación (Fig. 16a) y un aumento en la

interconectividad (Fig. 16b), pero no vemos diferencias en cuanto a los tipos mitocondriales encontrados, apareciendo por lo general una fragmentación a nivel distal y una agregación perinuclear (Fig. 16c).

La cuantificación de los niveles de interacción de GDAP1 con algunas proteínas de las encontradas mediante el ensayo de doble híbrido, muestra el diferente comportamiento en función del tipo de herencia de la mutación. Así, en mutaciones con un patrón de herencia dominante (GDAP1 p.R120W y p.T157P), los niveles de interacción aumentan de forma considerable. Por el contrario, en el caso de mutaciones de herencia recesiva (GDAP1 p.R120Q, p.R161H y p.R282C), no se encuentra un patrón característico por lo que depende, por tanto, del tipo de proteína mutante (Fig. 17a). Por ejemplo, en el caso de la mutación p.R161H encontramos un aumento similar a las mutaciones dominantes para la interacción con β -Tubulina y caytaxina y un descenso para PIKfyve. En el caso de caytaxina, las mutaciones p.R120Q y p.R282C, ambas recesivas, se produce un descenso significativo de la interacción.

Con el fin de conocer en qué lugar interaccionan estas proteínas realizamos diferentes construcciones con los dominios característicos de GDAP1, esto es GST-N, GST-C, *loop* α 4- α 5 y dominio transmembrana (TMB). Utilizando la misma estrategia que con la técnica de dos híbridos observamos que todas las proteínas ensayadas interaccionan con GDAP1 a través del *loop* α 4- α 5 (Fig. 17b).

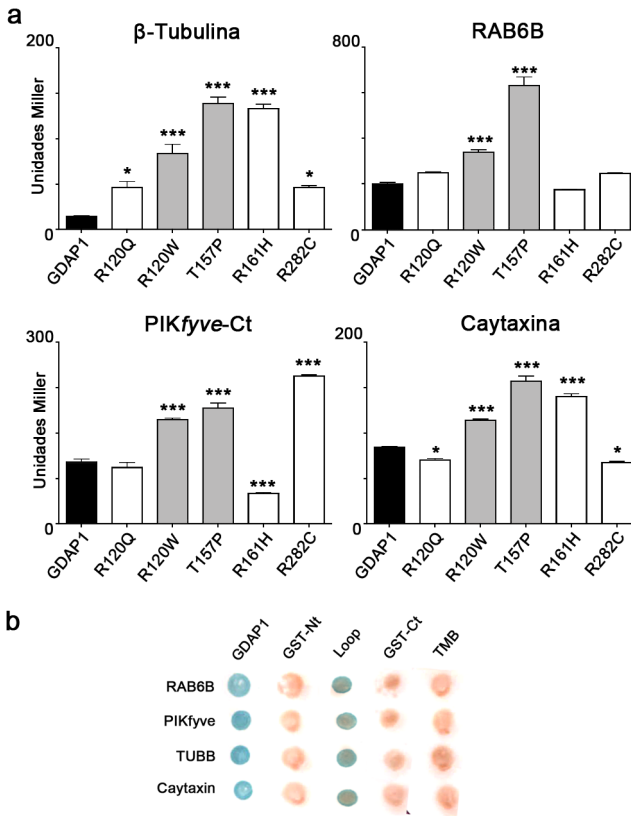


Figura 17. Cuantificación de la interacción de GDAP1 con diversas proteínas. (a) Análisis cuantitativo de la actividad β -galactosidasa en Unidades Miller. (b) Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa.

En cuanto a los procesos de movimiento y de la colocación interorgánulos, la expresión de las mutaciones en células HeLa tiene efectos muy llamativos. La presencia de gran número de proteínas del citoesqueleto, reguladores y motores moleculares, junto con el efecto observado con anterioridad en cuanto al movimiento mitocondrial, nos hizo plantear la posibilidad de que GDAP1 tuviera un efecto en el movimiento o transporte de la mitocondria.

Si comparamos las diferentes mutaciones vemos que podemos asociar el efecto al tipo de herencia de las mutaciones. Mientras que, las mutaciones dominantes p.R120W y p.T157P presentan niveles mayores de motilidad mitocondrial comparado con la expresión de *GDAP1*, las

mutaciones recesivas, p.R120Q, p.R161H y p.R282C no presentan aumento significativo en comparación con la expresión de *GDAP1* (Fig. 18a).

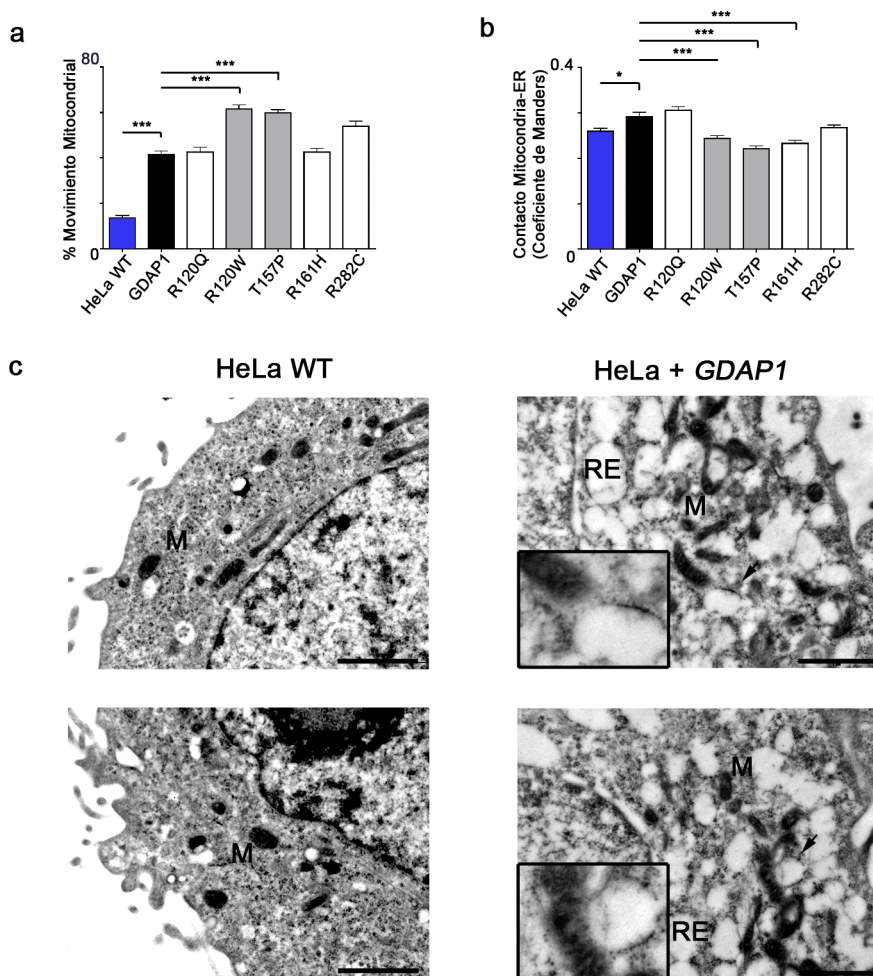


Figura 18. Efecto de la expresión de GDAP1 en células HeLa sobre parámetros morfológicos celulares. (a) Cuantificación del movimiento mitocondrial en células HeLa expresando las construcciones indicadas. (b) Cuantificación de los contactos mitocondria-RE en células HeLa expresando las construcciones indicadas. (c) Imágenes de microscopía electrónica de células HeLa y células HeLa expresando GDAP1. RE, retículo endoplásmico; M, mitocondria.

Una vez demostrado que la reducción de GDAP1 altera la relación de la mitocondria con el RE quisimos ver que efecto tendría la expresión de las diferentes mutaciones *missense*. En este caso, se transfectaron células HeLa con las construcciones correspondientes en pCMV-c-myc. La expresión de GDAP1 muestra un incremento en la colocalización entre RE y mitocondria comparado con las células sin transfectar (Fig. 18b). Por otro lado, si comparamos las diferentes mutaciones *missense* vemos que el efecto varía en función de la mutación. Para las mutaciones recesivas p.R120Q y p.R282C no se observan diferencias en comparación con la forma salvaje. Sin embargo, para las mutaciones p.R120W, p.T157P dominantes y, p.R161H recesiva, se observa un descenso significativo en la colocalización de estos dos orgánulos.

Este resultado se confirma con el resultado obtenido por microscopía electrónica (Fig 18c). La expresión de GDAP1 provoca un aumento considerable de cisternas de RE y vacuolas alrededor del núcleo, entre los que se encuentran intercaladas las mitocondrias. La expresión de GDAP1 provoca un fraccionamiento distal de las mitocondrias y una agregación perinuclear y es en esta zona donde se encuentra el RE, por lo que es fácil entender que la expresión de GDAP1 aumente drásticamente el contacto entre estos dos orgánulos al ponerlos físicamente más cerca. No obstante, cuál es el mecanismo que conduce a este efecto está aún por estudiar.

RESULTADOS

CAPITULO II. ANÁLISIS DE CAMBIOS FUNCIONALES CELULARES EN EL DÉFICIT DE GDAP1

1 La diferenciación neuronal de células SH-SY5Y deficientes en GDAP1 se relaciona con la falta de proteínas relacionadas con el citoesqueleto debido a una desregulación de la ruta AKT

Las células de neuroblastoma SH-SY5Y constituyen un buen marco en donde estudiar los procesos implicados en la biología de las células neuronales. En la línea celular de SH-SY5Y se observan dos tipos de células, las denominadas S (sustrato adherentes) y las N (neuroblásticas)⁸⁰. Durante el proceso de diferenciación, con la adición de ácido retinoico durante 5 días se consigue la disminución de las células tipo S y la adquisición por parte de las células tipo N de receptores para neurotrofinas.

Durante la diferenciación de los clones deficientes en GDAP1 lo primero que se observa es la adquisición de morfologías diferentes a las células control. Mientras que las células control comienzan a adquirir una morfología similar a las neuronas, con la aparición de prolongaciones desde el soma y reducción del volumen celular, los clones G1 y G4 adquieren una morfología más similar a fibroblastos, las células se alargan formando fibras y con cierto empaquetamiento.

El cambio a medio neurobasal junto con BDNF y AMP_c parece que mejora el efecto producido por el ácido retinoico. Todas las líneas adquieren una morfología similar aunque sí que se observa en las líneas silenciadas una menor capacidad proliferativa, además de una disposición más desordenada de las prolongaciones que parten desde los cuerpos celulares (Fig. 19a).

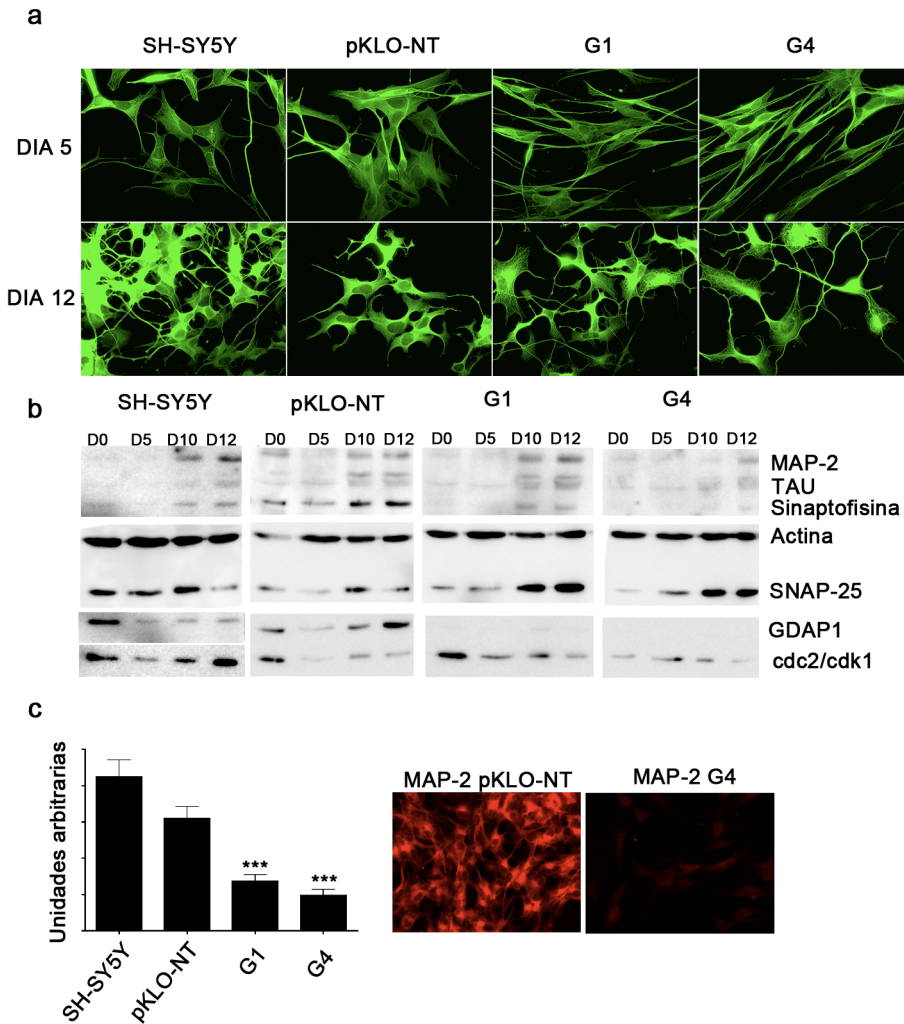


Figura 19. Diferenciación de células SH-SY5Y y clones de RNAi. (a) Imágenes de microscopía de fluorescencia en el que se observa el marcaje en verde con β -tubulina III. (b) Western Blot para diferentes marcadores de diferenciación neural. MAP2, proteína asociada a microtúbulos esencial en neurogénesis; TAU, proteína estabilizadora de microtúbulos específica de tejido neural; Sinaptofisina, proteína de vesículas postsinápticas; SNAP-25, proteína de vesícula presináptica; cdc2/cdk1, ciclina reguladora de proliferación celular; Actina, control de carga. (c) Cuantificación de la fluorescencia para el marcador de diferenciación MAP-2. *** $p < 0,001$

La adquisición de marcadores neuronales es variable en las tres líneas. Mientras que en la línea control se observa la aparición de marcadores como MAP2 (dendritas), TAU (axones), sinaptofisina (vesículas post-sinápticas), SNAP25 (vesícula presináptica) y disminución de la ciclina *cdc2/cdk1*, en las líneas G1 y G4 se observa que la adquisición es menor, siendo esto más acentuado en G4, el clon con mayor deficiencia en *GDAP1*, excepto para el marcador SNAP25 con el que no habrían diferencias (Fig. 19b). Los resultados se confirman en el microscopio de fluorescencia con el marcaje de la proteína MAP2, ausente en el clon G4 (Fig. 19c)

Una de las rutas activadas por el BDNF en la diferenciación neuronal es la ruta PI3K. Ya en condiciones basales (Fig. 20a), se observa la falta de fosforilación en los clones deficientes para *GDAP1*, G1 y G4. Como se ve en la imagen, en condiciones basales hay ausencia de fosforilación de AKT en la Thr 308 y Ser 9 para la proteína *GSK3 β* .

Una manera rápida de comprobar la activación de estas rutas es induciendo las células con insulina y monitorizar los cambios en un máximo de 2 horas (Fig. 20b). Las células de neuroblastoma responden a la insulina activando la ruta PI3K y desencadenando una serie de fosforilaciones específicas en proteínas de la ruta. Así, en las líneas deficientes para *GDAP1* se observa la ausencia de activación de la ruta por la falta de fosforilación de *GSK3 β* en la Ser 9 y de la proteína AKT en los aminoácidos Ser 308 y Thr 473, mientras que en los controles, la fosforilación en Thr 473, que no aparecía en condiciones basales, es visible al inducir con insulina. Este primer paso conlleva la fosforilación

de GSK3 β en la Ser 9 y de la proteína p70 en la Thr 389 que acaba con la expresión de proteínas de diferenciación. En los clones G1 y G4 al no activarse la proteína AKT se produce un bloqueo de la ruta que impide la fosforilación de proteínas efectoras como GSK3 β , P70 S6K y mTOR.

El bloqueo en la ruta AKT estaría provocando la falta de inhibición de GSK3 β lo que podría producir la diferenciación anómala.

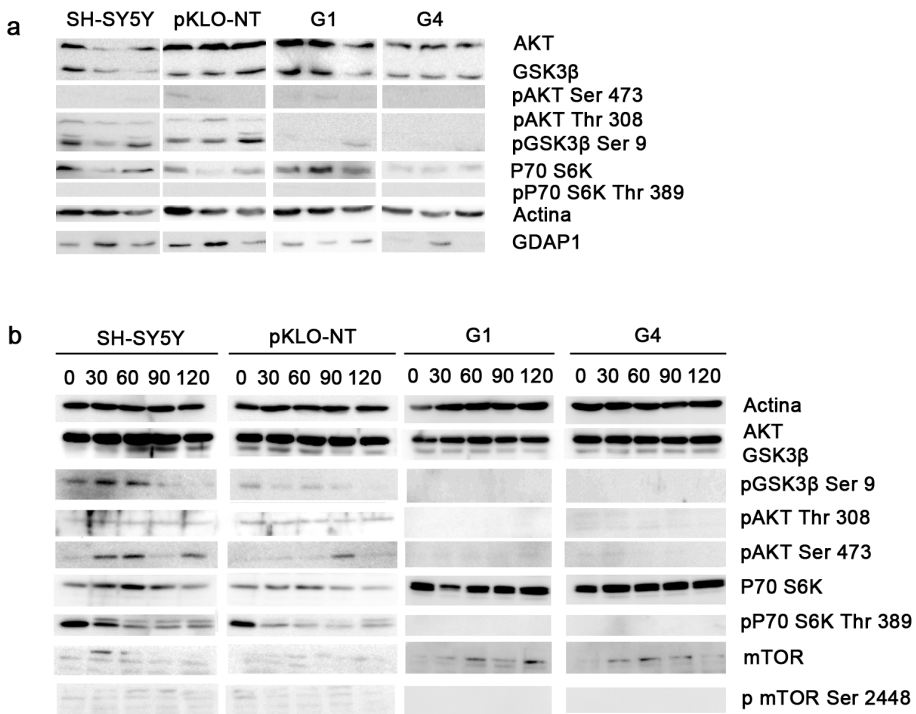


Figura 20. Expresión de proteínas pertenecientes a la ruta PI3K/AKT. (a) Expresión basal en tres muestras independientes por línea. Se muestran el resultado de tres muestras independientes por línea (b) Expresión en el tiempo inducida con 100nM de Insulina. Se muestra la secuencia temporal entre el tiempo 0 y 120 min desde la inducción con insulina.

2 El silenciamiento de *GDAP1* condiciona la susceptibilidad al estrés de retículo.

El estrés oxidativo es una de las principales causas de daño celular. De manera mayoritaria, las especies reactivas de oxígeno se producen en la mitocondria y afectan a muchos procesos, ya que los grupos reactivos formados interaccionan directamente con muchas proteínas, dificultando el plegamiento y su estabilidad.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la disminución de los niveles de *GDAP1* condiciona la aparición de estrés oxidativo pero cuyo origen no es mitocondrial. Esto se deduce al no encontrar ningún tipo de afectación en la cadena de transporte mitocondrial. Si bien es cierto que otros autores atribuyen una deficiencia en el complejo I en fibroblastos de pacientes enfermos de CMT con mutaciones en *GDAP1*¹³³, en nuestro laboratorio nunca se ha podido determinar la presencia de *GDAP1* en este tipo celular por lo que el estrés observado no sería desencadenado por alteraciones en *GDAP1*.

El retículo endoplásmico es una de las dianas principales de las especies reactivas de oxígeno producidas en los diferentes procesos celulares ya que afectan directamente al plegamiento de las nuevas proteínas. Como ya hemos determinado anteriormente, la falta de *GDAP1* o la presencia de mutaciones afecta directamente la relación de la mitocondria con el RE de modo que sería posible que este proceso condicionara el mal plegamiento de proteínas y con ello la aparición de estrés. La aparición de estrés de retículo se puede determinar por el aumento en proteínas específicas del plegamiento de las proteínas o de respuesta a estrés^{93, 110}

conocido como activación de la ruta UPR (*unfolded protein response*). Estas proteínas son la proteína de choque térmico BIP/GRP78, la proteína disulfuro isomerasa PDI, el factor de transcripción CHOP inductor de apoptosis y la fosforilación del factor de transcripción EIF2^{134, 135}. Con esta premisa, utilizamos dos inductores de estrés de retículo para ver la susceptibilidad de estas líneas celulares, tapsigarguina y tunicamicina.

La tapsigarguina es una droga que bloquea el principal canal de entrada de Ca²⁺ al RE, lo que produce la acumulación de Ca²⁺ en el citoplasma que afecta directamente a procesos de señalización y proteínas sensibles a Ca²⁺. De este modo, podemos simular el efecto producido por las especies reactivas de oxígeno que producen el vaciado de calcio del retículo aumentando la concentración del ion en el citoplasma⁹³.

De este modo, la inducción con tapsigarguina durante 18 horas desencadena la activación de la ruta UPR (*unfolded protein response*). En los clones deficientes de GDAP1 se produce la expresión exacerbada de la proteína BIP estadísticamente significativo en ambos clones (Fig. 21a). Cabe destacar también la presencia de la proteína EIF2 fosforilada de manera basal en el clon G1 lo que indicaría que ya está sufriendo algún tipo de estrés. Esta proteína aparece representada *de novo* en el clon G4 tras la inducción de estrés. Del mismo modo ocurre en el clon G4 para las proteínas ERO1 y SOD2. Aquí, la proteína ERO1 está incrementada incluso en condiciones basales mientras que la proteína SOD2 sólo tras la inducción. Podemos concluir entonces que la falta de GDAP1 condiciona la susceptibilidad al estrés de retículo.

Una vez demostrada la susceptibilidad al estrés por tapsigargina, el siguiente paso es comprobar si estas células acaban muriendo como consecuencia del daño producido. Esta vía comienza con el bloqueo de la ruta ERK y finalmente la activación de caspasas que producirán la muerte de la célula por apoptosis (Fig. 21b). En contra de lo esperado la inducción con tapsigargina no produce el bloqueo de la ruta ERK en los clones G1 y G4 y no se produce la activación de caspasas, como si de algún modo las células estuvieran protegidas frente a la apoptosis.

Una de las vías de rescate que poseen las células para escapar de la apoptosis es la autofagia. La proteína LC-3 es una proteína citoplasmática (LC-3 I) que se asocia al fagosoma antes de que este se una al lisosoma para degradación. Cuando este se asocia al fagosoma (LC-3 II) se produce una modificación post-traducciona que hace disminuir su peso molecular con lo que se puede intuir la cantidad de fagosomas por la cantidad de esta proteína.

En nuestro caso, y tras cuantificar la proporción de LC-3 II presente en extractos de células, observamos que los clones G1 y G4 poseen un aumento significativo de esta proteína que relacionamos directamente con un aumento en la ruta autofágica (Fig. 21c).

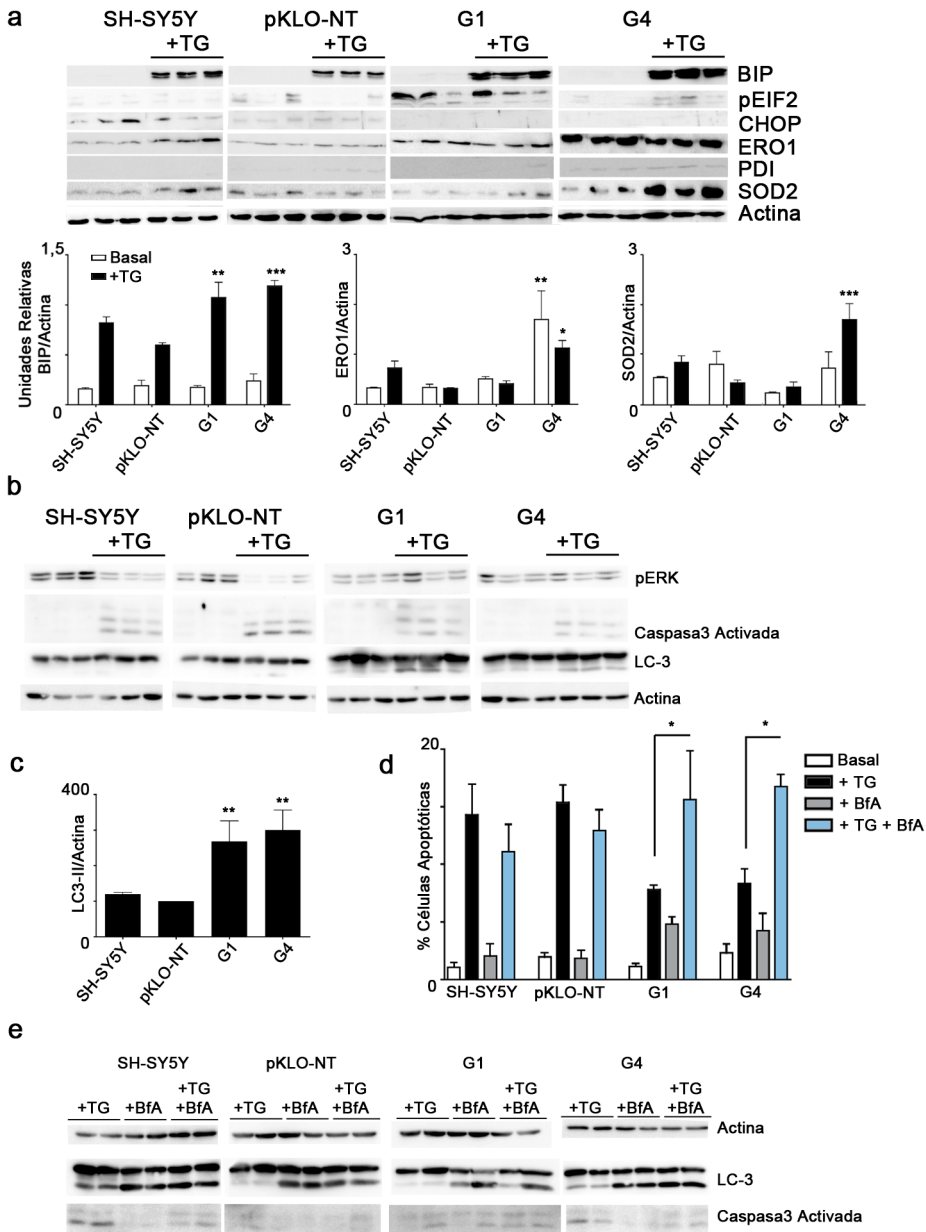
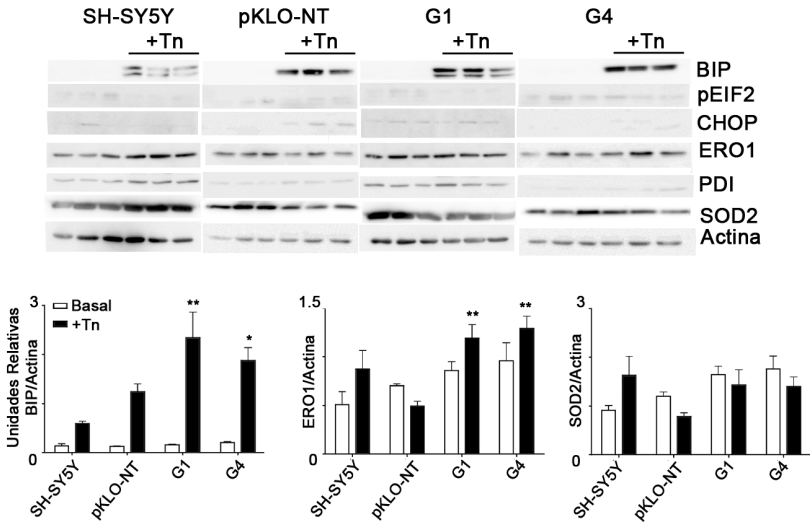
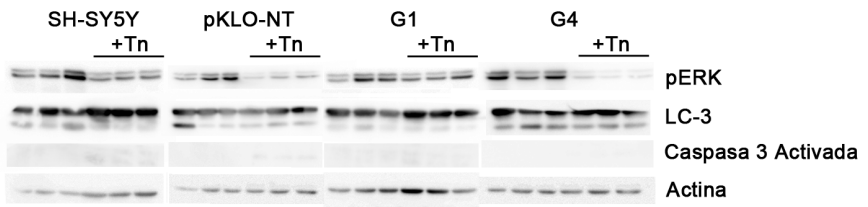


Figura 21. Inducción de estrés de retículo por tapsigarguina. (a) Marcadores para estrés de retículo antes y después de inducción con tapsigarguina. (b) Autofagia y apoptosis inducida por estrés de retículo. (c) Autofagia en condiciones basales. (d) Cuantificación por citometría de las células apoptóticas (e) Apoptosis en presencia de inhibidores de autofagia. TG, tapsigarguina; BfA, Bafilomicina A

a



b



c

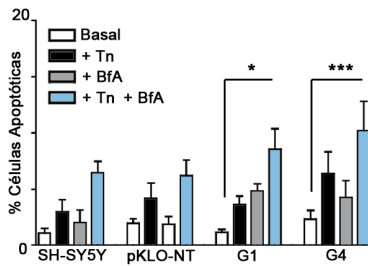


Figura 22. Inducción de estrés de retículo con tunicamicina. (a) Marcadores para estrés de retículo antes y después de inducción con tunicamicina. **(b)** Autofagia y apoptosis inducida por estrés de retículo. **(c)** Cuantificación por citometría de las células apoptóticas.

Con el objetivo de comprobar si este aumento en la autofagia es el responsable de la protección frente a apoptosis, bloqueamos la autofagia de modo que esperábamos ver cambios en los niveles de caspasas. Para ello utilizamos Bafilomicina A, una toxina que bloquea la fusión del fagosoma con el lisosoma. En contra de lo esperado, en extractos proteicos no se logra identificar grandes diferencias en este proceso (Fig. 21e). Sin embargo, mediante citometría de flujo (Fig. 21d) se observa que la inducción con tapsigarguina produce menos muerte celular en los clones G1 y G4 comparados con la línea control mientras que, si bloqueamos la autofagia, se produce un aumento significativo de la muerte por apoptosis en comparación con la inducción por la droga. Los resultados en western blot no son tan concluyentes (Fig. 21e).

Con estos datos, se pone de manifiesto la posible adaptación que sufren las células tras la inhibición de la expresión de GDAP1 que, aun siendo más susceptibles al estrés, evitan la ruta apoptótica incrementando la autofagia de los orgánulos o proteínas dañadas por ese estrés.

La tunicamicina es un antibiótico que bloquea la formación del enlace N-glicosídico de las proteínas durante su síntesis y plegamiento en el retículo endoplásmico. El bloqueo de la síntesis proteica condiciona la aparición de estrés de retículo. Del mismo modo que con la tapsigarguina, la inducción con tunicamicina activa la respuesta UPR. Después de 18 horas en presencia del antibiótico se produce un incremento significativo de la chaperona BIP y de ERO1 tanto en el clon G1 como en el G4 (Fig. 22a). Sin embargo, al contrario de lo que ocurría con la inducción con tapsigarguina, no se encuentran diferencias

significativas para el resto de proteínas. La activación de caspasa 3 tampoco se produce en este caso, pero se observa la disminución en la fosforilación de ERK y el incremento de LC-3 II en el clon G4; sin embargo este estímulo no es suficiente para desencadenar la activación de apoptosis (Fig. 22b). No obstante, la medición mediante citometría de flujo confirma estos resultados a la vez que muestra el efecto de la autofagia (Fig. 22c). Mientras que la inducción con tunicamicina no consigue desencadenar la apoptosis, la inhibición de la autofagia con bafilomicina A provoca un incremento significativo de la apoptosis sólo en los clones silenciados para *GDAP1*, confirmándose el resultado obtenido con la inducción por tapsigarguina.

Finalmente, con el objetivo de observar las diferencias entre los clones a nivel de ultraestructura, realizamos microscopía electrónica de transmisión para los clones pKLO-NT y G4 en estado basal y tras la administración de tapsigarguina (Fig. 22).

En condiciones normales, el clon G4 (Fig. 22a), presenta una gran cantidad de vacuolas y, además, una estructura mitocondrial alterada, las crestas mitocondriales están más desarrolladas y presentan una densidad mayor. Por otra parte, estas células presentan un RE dilatado en comparación con la línea control. En otros trabajos, hemos demostrado un incremento en la respiración mitocondrial producido por la disminución en los niveles de *GDAP1* (Bolinches-Amorós *et al.*, manuscrito en preparación), lo que podría explicar las diferencias en cuanto a estructura mitocondrial. Por otro lado, la vacuolización de las células es una característica típica en los procesos neurodegenerativos,

producido posiblemente por el incremento en la autofagia como el que observamos en estos clones. La presencia de RE dilatado puede estar indicando alguna alteración estructural como, por ejemplo, una mala comunicación con la mitocondria como venimos comentando a lo largo de este trabajo.

Curiosamente, la aplicación de tapsigargina produce la alteración de las diferentes estructuras celulares de la línea control de un modo similar a lo observado en el clon G4 (Fig. 22b). Se produce la dilatación del RE producido por el vaciado de Ca^{2+} y una alteración de las mitocondrias, en donde se incrementa el numero de mitocondrias alteradas y la densidad de las mismas.

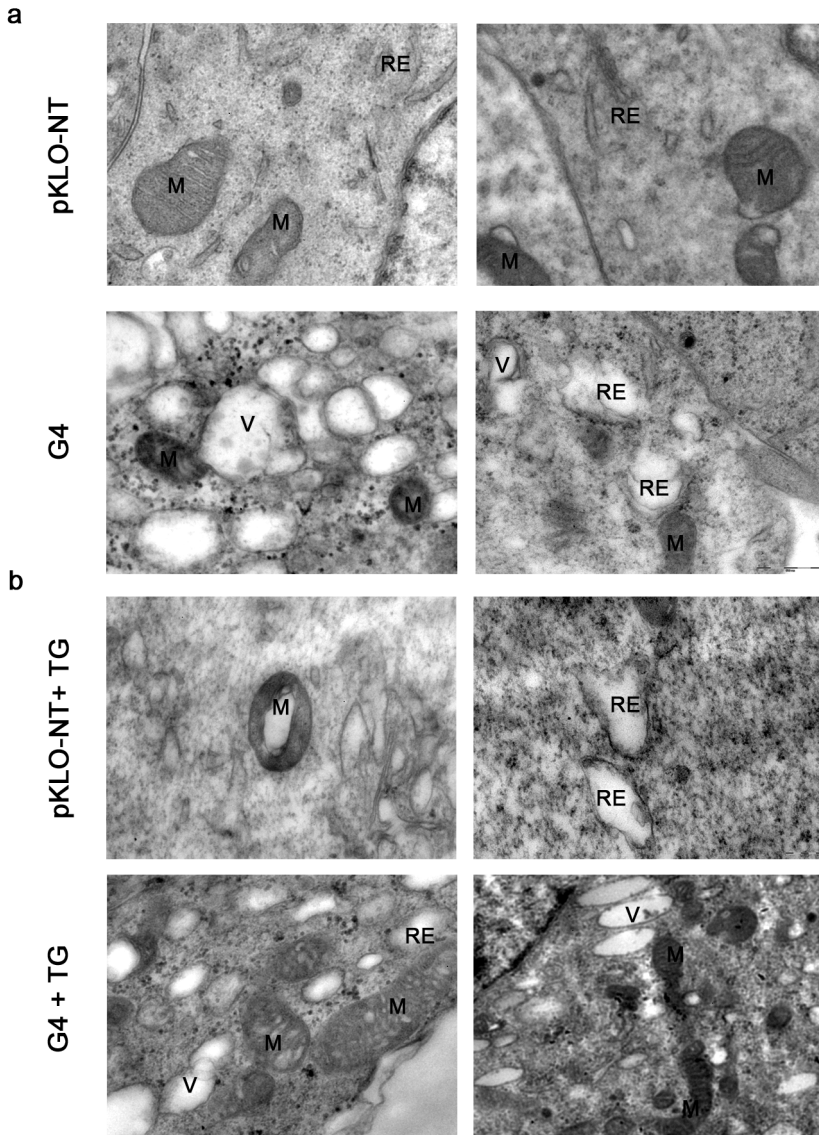


Figura 22. Ultraestructura de los clones de neuroblastoma. (a) Ultraestructura en condiciones basales. **(b)** Ultraestructura después de la aplicación de taspigargina 1uM durante 5 minutos. M, mitocondria; RE, retículo endoplásmico; V, vacuolas.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es una de las enfermedades neurológicas hereditarias más comunes y complejas que existen. Se conocen más de 40 genes implicados en la misma enfermedad o neuropatías relacionadas, con variaciones en cuanto a la gravedad de la enfermedad en función del gen afectado y, en ocasiones, también del modo de herencia.

Las proteínas implicadas en la enfermedad de CMT van desde proteínas formadoras de mielina, proteínas del citoesqueleto, tráfico vesicular, traducción de proteínas y proteínas de dinámica mitocondrial. La implicación de GDAP1 y MFN2 en la enfermedad de CMT sitúa a la mitocondria como en un nuevo campo de estudio para entender la fisiopatología de la enfermedad.

En un principio se planteó a GDAP1 como un factor de fisión mitocondrial^{24, 25}. La expresión en células de mamífero suponía la fragmentación de la red mitocondrial y la agregación de estas alrededor del núcleo. Resulta llamativo pensar en GDAP1 solamente como factor de fisión ya que los mecanismos moleculares que controlan los procesos de dinámica mitocondrial están muy conservados evolutivamente, y GDAP1 solo aparece ya en organismos superiores²³, mayoritariamente vertebrados. Es difícil pensar en que la evolución haya favorecido la aparición de una nueva proteína con una función similar a proteínas ya existentes.

La evidencia experimental que promueve la incógnita sobre la función de GDAP1 se vio al sobreexpresar diferentes mutaciones patológicas en

células de mamífero. Si la fisión mitocondrial es el mecanismo por el cual GDAP1 actúa, la presencia de mutaciones *missense* patológicas deberían alterar este proceso. Sin embargo, no se observaban diferencias en cuanto al patrón mitocondrial encontrado²⁶. Más recientemente se describió a GDAP1 como un factor de fisión dependiente de Fis1 y Drp1 con lo que su función exclusiva a los procesos de dinámica mitocondrial quedaba en entredicho²⁸.

Recientemente, utilizando cepas de levaduras deficientes en genes de los procesos de dinámica mitocondrial, hemos visto que GDAP1 es capaz de complementar y rescatar el fenotipo presente en levaduras deficientes para el gen de fisión mitocondrial Fis1p²⁹. Además, diferentes mutaciones *missense* rescatan algunos aspectos del fenotipo de las levaduras mutantes como son la supervivencia frente a factores de estrés y crecimiento celular, aunque otros como defectos en ciclo celular no son complementados²⁹. Por todo lo expuesto, no resulta difícil pensar en GDAP1 como una proteína con una función más compleja que los procesos de fisión mitocondrial.

La finalidad de este trabajo ha sido el conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad de CMT causada por mutaciones en el gen GDAP1. Para ello, hemos intentado ir más allá de los procesos de dinámica mitocondrial para conocer el mecanismo por el cual se produce la neurodegeneración y poder proponer un modelo más completo sobre la biología de GDAP1.

1 GDAP1 como una molécula “adaptadora” de la mitocondria al citoesqueleto.

Una manera de conocer la función de una proteína y situarla dentro de algún proceso celular es conocer las proteínas con las que interacciona. El análisis por doble híbrido es un método sencillo y robusto para la identificación de proteínas que interaccionan entre sí; aun cuando existe la posibilidad de identificación de falsos positivos, existen métodos para obviarlos y confirmar las proteínas que realmente interaccionan.

El análisis de doble híbrido para la proteína GDAP1 frente a una genoteca de cerebro humano revela que interacciona principalmente con proteínas relacionadas con el citoesqueleto y señalización. En cuanto al número de clones aislados, la proteína GABARAP se presenta como la mayoritaria. Se trata de una proteína pequeña relacionada con procesos de transducción de señal de receptores GABA y en procesos de autofagia. Sin embargo, aun siendo la proteína mayormente representada no hemos podido verificar la interacción mediante coimmunoprecipitación. Diferentes estudios determinan que la proteína GABARAP también se une a microtúbulos y a proteínas relacionadas con el citoesqueleto¹³⁶. Dado que en el sistema de doble híbrido no se trabaja con proteínas enteras si no con fragmentos amplificados, es posible que la proteína GABARAP, al ser más pequeña, estuviera más representada en la genoteca, haciendo posible la aparición de tan elevado numero de interacciones.

Las interacciones confirmadas de GDAP1 con las proteínas de tráfico vesicular de orgánulos tanto anterógrado como retrógrado, caytaxina y

RAB6B respectivamente, hacen suponer que GDAP1 pueda facilitar el movimiento de la mitocondria a través de la red de microtúbulos en ambas direcciones. La presencia también de proteínas de membrana nos lleva a pensar en la posibilidad de que GDAP1 funcione como un adaptador para el posicionamiento y localización de la mitocondria, participando en la correcta distribución de la red mitocondrial.

Por otra parte, GDAP1 se asocia en la membrana mitocondrial externa formando dímeros y además, bien de manera directa, bien indirecta GDAP1 regula de algún modo la dinámica mitocondria como factor dependiente de Fis1 y Drp1²⁸. Hemos visto que GDAP1 también puede interaccionar consigo misma, lo que podría ayudar a la interacción de varias membranas mitocondriales.

Como hemos comentado anteriormente, en un estudio reciente con mutantes de levadura para genes de fisión y fusión mitocondrial, GDAP1 es capaz de rescatar el posicionamiento de la mitocondria en mutantes de levadura para la proteína Fis1p²⁹. En este caso, la cepa deficiente en Fis1p posee una red mitocondrial posicionada lateralmente, mientras que la cepa salvaje posee una red distribuida alrededor de la célula. La expresión de GDAP1 recupera el posicionamiento anómalo de las mitocondrias redistribuyéndolas alrededor de la célula.

Uno de los mayores problemas a la hora de plantear una hipótesis de trabajo a partir de las proteínas interactoras encontradas fue la asociación de dichas proteínas con la mitocondria. La proteína caytaxina sí que se había relacionado con la mitocondria como un adaptador para

transporte anterógrado¹¹⁸, sin embargo, no ocurría lo mismo con la proteína RAB6B.

Las proteínas RAB6 son proteínas pequeñas pertenecientes a la superfamilia de las Ras GTPasas que actúan como adaptadores moleculares en procesos de tráfico vesicular en varios puntos. Existen tres tipos de proteínas RAB6, RAB6A y RAB6A', codificadas por el mismo gen *RAB6A* en el cromosoma 11 y, RAB6B codificada en por otro gen en el cromosoma 3 y de localización exclusiva de tejido nervioso¹²⁰. A nivel celular, RAB6B ha sido localizada en el aparato de Golgi y en vesículas que se alinean con microtúbulos. Junto con la proteína bicaudal-D1, RAB6B también colocaliza con dineínas en las neuritas sugiriendo que está involucrada en transporte retrógrado^{121, 137}.

Los experimentos de colocalización con diferentes marcadores de orgánulos celulares revelaron que RAB6B se localiza, tal como se había descrito, en el aparato de Golgi. Sin embargo, se observa también, que cuando RAB6B se encuentra activa (unido a GTP γ S o la variante RAB6B^{P.Q72L}), localiza con mitocondrias contactando en determinados puntos. Además, el fraccionamiento subcelular muestra la asociación de RAB6B a las mitocondrias, en MAMs. Funcionalmente, la expresión de RAB6B produce cambios en la morfología mitocondrial sólo cuando GDAP1 está presente. En células HeLa no hay expresión de GDAP1 por lo que es posible que si la proteína RAB6B se une a la mitocondria a través de GDAP1, al no existir éste, no pueda ejercer su efecto. Por el contrario, la expresión de la forma activa de RAB6B junto con GDAP1

revierte el fenotipo de fisión que se produce al expresar GDAP1 llevando a las células a una morfología mitocondrial tubular.

Por el contrario, la proteína caytaxina sí que ejerce efecto sobre las mitocondrias provocando la fisión de la red. Este efecto se ve incrementado al expresarla conjuntamente con GDAP1.

Estos resultados nos llevan a plantearnos la posibilidad de un proceso regulado en dos direcciones. Uno que relacionaría el transporte retrógrado con la fusión, tal como se ha descrito en vesículas de transporte para la proteína RAB6B, y otro que relacionaría el transporte anterógrado con la fisión. En células neuronales el transporte retrógrado se produce hacia el soma, y es aquí donde se encuentra el cuerpo mitocondrial fusionado mientras que, para viajar a través de axones y dendritas de manera anterógrada, las mitocondrias puedan sufrir un mayor grado de fisión. Es posible que por este motivo, la expresión de GDAP1 en células no neuronales como HeLa o Cos7 produzcan ese patrón mitocondrial tan característico de fusión o agregación alrededor del núcleo y fisión a nivel distal.

GDAP1 es una proteína perteneciente a la familia de las Glutation-S-transferasas²³, proteínas que poseen alta similitud entre ellas y función similar. Sin embargo, GDAP1 posee ciertas características propias que la incluyen en un nuevo subgrupo dentro de las proteínas GST, como la presencia de dominios transmembranas y el *loop* α 4- α 5 ausente en la mayoría de estas proteínas. Las proteínas GST actúan principalmente en

procesos de destoxificación y reducción de especies reactivas de oxígeno aunque aun no se ha encontrado actividad GST funcional.

No existe una distribución característica de las mutaciones encontradas en GDAP1. La mayor parte de las mutaciones corresponden a mutaciones *missense* aunque también encontramos mutaciones *non-sense*, *frameshift* y en sitios de *splicing*¹³⁸. Mientras que las primeras alterarían la función de la proteína el resto produciría proteínas truncadas con falta de función.

Dado que GDAP1 es una proteína con una serie de dominios bien caracterizados, la localización de las mutaciones debe afectar a la función característica de dicho dominio. Así, se ha visto que mutaciones en el extremo Ct de la proteína, la región transmembrana, afectan al correcto anclaje de GDAP1 en la membrana mitocondrial externa²⁷; no ocurre lo mismo para el resto de dominios en los que se desconoce la función, aunque recientemente se ha descrito que las mutaciones dominantes alteran la fusión mitocondrial con aparición de estrés oxidativo, mientras que las recesivas alterarían la fisión²⁸.

Mediante el análisis de β -galactosidasa en filtro, utilizando la técnica de dos híbridos, hemos determinado que la interacción con otras proteínas se produce mediante el loop $\alpha 4$ - $\alpha 5$. Para ver el efecto de las diferentes mutaciones realizamos el experimento de β -galactosidasa en fase líquida y comprobamos, no sólo que las proteínas siguen interaccionando con GDAP1, sino que también se producen variaciones en los niveles de interacción en las mutaciones cercanas al *loop*. En las dos mutaciones

dominantes analizadas, el incremento en la interacción con las distintas proteínas es más acusado. Para el caso de caytaxina, las mutaciones recesivas cercanas al *loop* se produce un descenso en la interacción.

Teniendo en cuenta que la interacción se produce en el *loop*, las variaciones de aminoácidos en esa región pueden modificar la estructura tridimensional de la proteína alterando su zona de unión, lo que puede provocar uniones más estables o más débiles con las otras proteínas de modo que se modifiquen los patrones de interacción. En el caso de las dos mutaciones dominantes, en la mutación p.R120W, el cambio que se produce es del aminoácido Arg a Trp, es decir, de un aminoácido cargado positivamente a uno con cadena aromática con facilidad de producir uniones hidrofóbicas de manera que la unión entre dos proteínas sería más estable y por ello se incrementase la interacción. Para la mutación p.T157P, se pasa del aminoácido treonina, polar y sin carga, a la prolina, aminoácido apolar y alifático que reduce la flexibilidad de las estructuras debido a la presencia del grupo amino secundario.

Por otro lado, la electroforesis en condiciones nativas nos ha permitido conocer la organización en la membrana mitocondrial de GDAP1. En las proteínas de la familia de las GST, los dominios GST son dominios susceptibles de dimerización. La medida de las distancias entre los diferentes complejos y la coimmunoprecipitación ha revelado que GDAP1 se organiza formando dímeros. Por el contrario, la presencia de mutaciones afecta a la distancia recorrida de modo que, las mutaciones presentes en los dominios GST aumentan la distancia, lo que se corresponde con un menor tamaño del complejo, mientras que en las de

otros dominios no se observan diferencias. El efecto de las mutaciones *missense* es variable afectando tanto a la interacción con otras proteínas como a la organización molecular de la proteína.

A lo largo de este trabajo se ha intentado buscar la fisiopatología molecular de la enfermedad. Los cambios mutacionales pueden inducir modificaciones estructurales que producen variaciones en los procesos celulares en los que están implicadas las proteínas. Para el desarrollo del trabajo se han utilizado dos modelos celulares que tratan de imitar el efecto de las mutaciones patológicas. Por una parte, la sobreexpresión en células HeLa nos informa sobre el efecto por presencia de una mutación *missense*. Por el contrario, el modelo *knock-down* en células de neuroblastoma trataría de imitar el efecto de mutaciones de parada, de cambio de pauta o de *splicing* en las que el efecto es el de pérdida de función.

La publicación en el año 2008 por parte de Brito y Scorrano de la implicación de la proteína MFN2 en la homeostasis de Ca^{2+} nos llevó a pensar en que la proteína GDAP1 pudiera tener una función en el mismo proceso. Ambas proteínas están implicadas en mayor o menor medida en procesos de dinámica mitocondrial y, además, las dos producen dos formas de la enfermedad de CMT axonal.

Los experimentos de Ca^{2+} citosólico demuestran claramente que la falta de GDAP1 condiciona la correcta homeostasis de Ca^{2+} y la señalización dirigida a mitocondria, concretamente en la entrada capacitativa de calcio (SOCE). Este mecanismo es dependiente de que las mitocondrias

estén funcionando correctamente y posicionadas cerca de la membrana plasmática. Como hemos demostrado, la deficiencia en GDAP1 no cambia la cinética de captación de Ca^{2+} o la capacidad de retención, por lo que el descenso en el SOCE debe ser producido por el incremento en la concentración local de calcio debido posiblemente a una incorrecta distribución mitocondrial y un posible defecto en la comunicación entre las mitocondrias y el retículo endoplásmico.

El calcio es un ion que señala muchos procesos celulares. La señalización por calcio es crítica para el correcto movimiento de las mitocondrias, procesos de fusión y fisión, bioenergética, etc. Por este motivo, y dado que GDAP1 interacciona con proteínas de tráfico vesicular realizamos mediciones *in vivo* del movimiento mitocondrial. La expresión de GDAP1 produce un incremento de la motilidad mitocondrial, que es aun mayor para las mutaciones dominantes. Lo mismo ocurre en los clones deficientes en GDAP1. El análisis de colocalización con la sobreexpresión de diferentes mutaciones revela que, al igual que en los clones de RNAi, las mutaciones dominantes provocan un descenso en los puntos de contacto entre la mitocondria y el RE. Por este motivo, dado que el efecto en estos parámetros es igual para mutaciones con herencia dominante como para la falta de la proteína, proponemos que la causa del tipo de herencia dominante sea debido a un efecto de dominancia negativa, es decir, la presencia del alelo mutado enmascara funcionalmente al alelo normal, produciéndose la enfermedad.

La falta de la proteína GDAP1 también condiciona la relación entre las mitocondrias de la célula. Como se ha visto, la ausencia de GDAP1 provoca un descenso de la conectividad mitocondrial que es recuperado al expresar la proteína normal. En el caso de mutaciones *missense* no es posible relacionar el tipo de herencia con el efecto observado ya que, la mutación p.R161H recesiva produce un efecto similar a las dos mutaciones dominantes y diferente a las mutaciones recesivas p.R120Q y p.R282C. Esta falta de conectividad puede también estar implicada en el efecto fisiológico observado, marcando también la funcionalidad de las mitocondrias en las células afectadas.

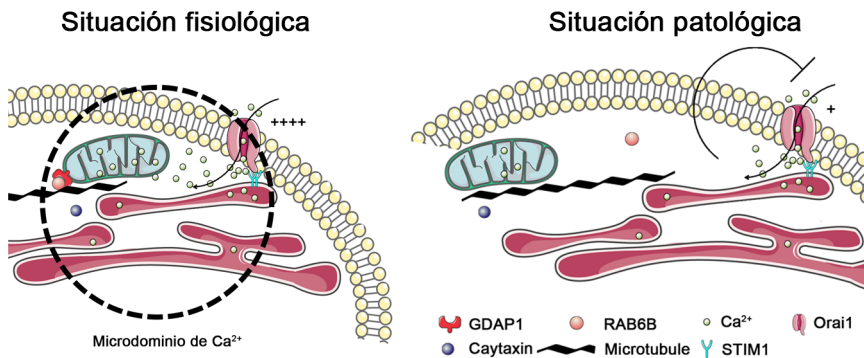


Figura 23. Modelo propuesto para el funcionamiento de GDAP1. Se muestran las dos hipotéticas situaciones que se producirían. En situación fisiológica GDAP1, junto con Caytaxina y RAB6B posicionarían la mitocondria cercana a los microdominios de Ca^{2+} y permitiendo la entrada eficiente de Ca^{2+} por SOCE. En una situación patológica la mitocondria, bien por ausencia de GDAP1 o por presencia de mutaciones *missense* afectarían el correcto posicionamiento de la mitocondria con lo que, al no poder retirar el Ca^{2+} que entraría por SOCE, se produciría la inhibición de los canales CRAC evitando la entrada de más Ca^{2+} y la recarga del RE.

Con todos los resultados vistos hasta ahora podemos proponer un modelo sobre la función de GDAP1. En condiciones normales (Fig. 23 izquierda) GDAP1 actuaría como una molécula “adaptadora” que facilita el movimiento e interacción de la mitocondria en el citoesqueleto. La presencia de mutaciones recesivas variaría los niveles de interacción de GDAP1 con otras proteínas, de modo que la mitocondria quedaría más o menos anclada a los microtúbulos o a las proteínas motoras impidiendo el correcto posicionamiento y distribución. En el caso de mutaciones *missense* dominantes, el incremento en la interacción provocaría un anclaje de la mitocondria al esqueleto de microtúbulos impidiendo la correcta distribución (Fig. 23 derecha). La falta de la proteína por mutaciones *missense* de parada, produciría una mala distribución de las mitocondrias alterando la relación de ésta con el resto de la célula. La proteína STIM1 reconocería el vaciado del RE de Ca^{2+} y activaría el SOCE tras la interacción con Orai1, sin embargo, la incorrecta distribución de las mitocondrias produciría que el proceso no fuera tan eficiente, de modo que la entrada capacitativa de calcio se vería disminuida.

2 Fisiopatología asociada a la reducción en los niveles de GDAP1

Las neuronas son células altamente especializadas que reciben, integran y envían información sobre los movimientos, el ambiente, las sensaciones, etc. Aun cuando GDAP1 se encuentra tanto en sistema nervioso central como periférico²⁶, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth afecta solo al sistema nervioso periférico, tanto a neuronas sensitivas como motoras.

Las células SH-SY5Y son una línea celular derivada de un neuroblastoma humano. Son células con alta capacidad proliferativa con ciertas características neurales y además, susceptibles de diferenciación con la adición de determinados compuestos. Durante el proceso de diferenciación se activan un gran número de genes que van a otorgar a la célula las características específicas, entre ellos GDAP1 que ve incrementado su expresión⁹⁰.

Hemos demostrado que la ausencia de GDAP1 condiciona la señalización por calcio hacia la mitocondria desde el SOCE. Por esto, no es de extrañar que en células deficientes para GDAP1 se produzca un proceso de diferenciación anómala. Las cascadas de señalización que activa el BDNF conllevan señalización por calcio. La ausencia de GDAP1 incrementa la distancia entre la mitocondria y el RE por lo que la señalización que debe llegar a la mitocondria se ve alterada, lo que puede producir, por ejemplo, falta de ATP o diversos metabolitos imprescindibles en el proceso de diferenciación.

En nuestro modelo, hemos determinado que existe una desregulación de la ruta AKT. La cascada de señalización PI3K/AKT está implicada en muchos procesos celulares como neurogénesis o supervivencia celular¹³⁹. En este sentido, la mitocondria no es sólo el orgánulo encargado de proporcionar ATP sino que también regula la señalización respondiendo a los estímulos fisiológicos¹⁴⁰. PI3K/AKT regula genes de supervivencia bloqueando la activación de rutas de muerte celular¹⁴¹. Diferentes dianas de la ruta PI3K/AKT interaccionan directamente con la mitocondria para la liberación o el bloqueo de factores apoptóticos¹⁴⁰. En nuestro caso, la

señalización mitocondrial por calcio del SOCE esta alterada lo que podría explicar la baja viabilidad celular durante el proceso de diferenciación además de la falta de expresión de proteínas típicas de células diferenciadas.

Los experimentos de estrés de retículo muestran que la ausencia de GDAP1 condiciona la susceptibilidad a este tipo de estrés. La tapsigarguina y la tunicamicina actúan en dos niveles diferentes para producir el mismo tipo de estrés. Sorprendentemente, los resultados muestran una mayor susceptibilidad al estrés producido por tapsigarguina. Tomando en consideración todo lo expuesto, la inducción por tapsigarguina produce el vaciado de Ca^{2+} del retículo, lo que produciría la activación del SOCE y la posterior recarga del orgánulo. Si GDAP1 no está presente, la mitocondria mal posicionada produciría un SOCE disminuido que evitaría la recarga del retículo con calcio, lo que podría ser la causa tanto del estrés de retículo observado, como de la morfología anómala del RE que se observa en las imágenes de microscopía electrónica para el clon G4.

Los defectos en la recarga de calcio del RE producidos por un SOCE deficiente desestabilizarían el orgánulo impidiendo un correcto funcionamiento de éste. Las variaciones en los niveles de calcio alterarían, por ejemplo, el correcto plegamiento de las proteínas, lo que podría explicar el incremento en autofagia. La ausencia de fosforilación en la proteína P70 se puede presentar quizás como una adaptación a la desregulación de la ruta y evitando de este modo la muerte por apoptosis.

La desregulación de los procesos de homeostasis de calcio ha sido relacionada con el daño celular en muchos tipos de tejidos. En las neuronas, por ejemplo, la neurotoxicidad inducida por glutamato está asociada con un incremento prolongado de Ca^{2+} y se plantea que la acumulación excesiva de éste en el citoplasma produce grandes pérdidas neuronales como las que ocurren en isquemia y el trauma cerebral^{142, 143}.

Los efectos que se producen en la mitocondria derivados de la señalización por calcio son muy diversos. Así, el transportador malato-aspartato NADH se encuentra regulado por el incremento en la concentración de calcio¹⁴⁴ produciendo a su vez la activación de rutas de biosíntesis como el ciclo de Krebs incrementando el ratio NADH/NAD¹⁴⁵. Sin embargo, la captación de calcio debe de estar altamente regulada ya que la sobrecarga también se ha relacionado directamente con la activación de rutas apoptóticas¹⁴⁶; por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Parkinson, se ha relacionado las mutaciones en el gen *PINK1* con la sobreestimulación del transportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ provocando la sobrecarga por parte de la mitocondria y derivando en la activación de rutas de apoptosis¹⁴⁷. En otro modelo de enfermedad de Parkinson con células de neuroblastoma, se relacionó la presencia de mutaciones en la proteína α -sinucleína con un descenso en la capacidad de readmisión de calcio después del vaciado del RE¹⁴⁸, un resultado similar al que hemos encontrado nosotros en el caso de GDAP1.

Se conoce desde hace años que el tratamiento con agentes quelantes¹⁴⁹ o inhibidores de canales de calcio puede poseer efectos protectores en las

células¹⁵⁰; por ejemplo, el tratamiento con calbindina-D28K hace a las células más resistentes a muerte celular¹⁵¹.

Por otra parte, el Ca^{2+} también regula el comportamiento de la mitocondria. Así, el transporte mitocondrial se encuentra regulado mediante la proteína adaptadora Miro, la cual posee dominios de unión a Ca^{2+} y funciona de intermediario entre la mitocondria y motores moleculares¹⁵². Se conocen muchas enfermedades neurodegenerativas en las que el transporte axonal se encuentra alterado como por ejemplo la enfermedad de Huntington¹⁵³, la enfermedad de Alzheimer¹⁵⁴ e incluso la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A¹⁵⁵ y 2B¹¹⁴.

Desde el punto de vista fisiológico cabe destacar la importante función de las mitocondrias en la unión neuromuscular. Se ha demostrado que son las mitocondrias las encargadas de captar rápidamente el calcio y disipar la señal producida⁶¹. Como ejemplo, en la esclerosis lateral amiotrófica y en la enfermedad de Alzheimer, en donde, en el primer caso se produce la degeneración específica de motoneuronas provocada por la desregulación en el tamponamiento de calcio por parte de la mitocondria¹⁵⁶, mientras que en el Alzheimer, mutaciones en el gen de la preselina (*PS1*) producen la extrusión incontrolada de Ca^{2+} desde el RE que conlleva daño proteico produciendo la acumulación de proteína β -amiloide¹⁵⁷.

El efecto molecular de esta desregulación se encuentra en la desestabilización de los axones de las células afectadas. Así, el evento crucial en la degeneración del axón es la desintegración del citoesqueleto

y el axoplasma. La lesión estructural del axón se correlaciona con la pérdida de la capacidad para generar y conducir el potencial de acción¹⁵⁸ mientras que, la desintegración del citoesqueleto es producida por el aumento de calcio axoplásmico¹⁵⁹. El aumento del nivel de calcio en el citoplasma activa proteasas calcio-dependientes, las cuales digieren los neurofilamentos, parte importante del citoesqueleto del axón^{160, 161}.

El efecto de esta degeneración axonal es la pérdida del contacto de las células de Schwann con los axones produciendo una disminución de los niveles de mRNA de proteínas componentes de la mielina afectándose la biología de la interacción axón-célula de Schwann¹⁶².

Es, pues, en este marco de alteración de la interacción de la mitocondria con el citoesqueleto y el RE, así como en la alteración de la regulación del SOCE, donde proponemos que subyace la fisiopatología celular de la enfermedad CMT causada por mutaciones en *GDAP1*.

CONCLUSIONES

1. GDAP1 interacciona con proteínas del tráfico vesicular de orgánulos y consigo misma. La reducción en los niveles de GDAP1 o la presencia de mutaciones *missense*, afectan a la relación de la mitocondria consigo misma y con el RE alterando procesos fisiológicos celulares. Por este motivo, proponemos que GDAP1 pueda actuar como una molécula “adaptadora” de la red mitocondrial regulando su correcta distribución e interacción celular.
2. Hemos comprobado que la disminución de GDAP1 altera la distribución de la red mitocondrial y condiciona la relación de la mitocondria con el retículo endoplásmico de manera similar a la proteína MFN2. Además, la ausencia de GDAP1 modifica la morfología tanto de la red mitocondrial como del RE. De este modo, se relaciona la fisiopatología de dos de los más recurrentes tipos de CMT en un mismo proceso celular.
3. Dado que el efecto fisiológico de las mutaciones con herencia dominante es similar al obtenido para la inhibición de GDAP1, postulamos que las mutaciones de cambio de sentido de GDAP1 con herencia dominante actuarían como dominantes negativos enmascarando la función del alelo normal.
4. El efecto patológico de las mutaciones de GDAP1 con herencia recesiva se debería a una variación en los niveles de interacción con otras proteínas, lo que condicionaría la correcta relación de la mitocondria con el retículo endoplásmico y el citoesqueleto.

5. Hemos demostrado que GDAP1 está involucrado de manera directa en el mecanismo de entrada capacitativa de calcio. La depleción de GDAP1 produce una disminución de la entrada de calcio a través del mecanismo del SOCE, producido posiblemente por una incorrecta distribución de las mitocondrias en la célula.

6. La falta de GDAP1 imposibilita la diferenciación correcta y estable de las células de neuroblastoma a células de tipo neuronal por una desregulación de la ruta PI3K/AKT, lo que en un contexto más amplio se podría traducir en una incapacidad por mantener el estado diferenciado.

7. La ausencia de GDAP1 condiciona la aparición y susceptibilidad de estrés de retículo a lo que las células responden con un incremento en la autofagia que también podría deberse al bloqueo de la ruta PI3K/AKT.

8. La desregulación en los procesos de homeostasis de Ca^{2+} podría ser el punto de partida al mecanismo que subyace al proceso de neurodegeneración en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth por mutaciones en GDAP1.

BIBLIOGRAFÍA

1. Combarros O, Calleja J, Polo JM, Berciano J. Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurol Scand* 1987;75:9-12.
2. Lupski JR, Garcia CA. Molecular genetics and neuropathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain Pathol* 1992;2:337-349.
3. Holmberg BH. Charcot-Marie-Tooth disease in northern Sweden: an epidemiological and clinical study. *Acta Neurol Scand* 1993;87:416-422.
4. Martyn CN, Hughes RA. Epidemiology of peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:310-318.
5. Reilly MM, Murphy SM, Laura M. Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 2011;16:1-14.
6. Dejerine J, Sottas J. Sur la névrite interstitielle, hypertrophique et progressive de l'enfance. Affection suvent familiale et a debut infantile, caracterisée par atrophie sensibilité et ataxie des mouvement set relevant d'une névrite medullaires associées. . *CR Soc Biol (Paris)* 1893;45:63-96.
7. Roussy G, Levy G. Sept cas d'une maladie familiale particulière. *Rev Neurol* 1926;1:427-450.
8. Dyck P, Lambert E. Lower motor and primary sensory neuron disease with peroneal muscular atrophy I. Neurologic, genetic and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol* 1968;18:603-625.
9. Dyck P, Lambert E. Lower motor and primary sensory neuron disease with peroneal muscular atrophy II. Neurologic, genetic and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol* 1968;18:619-625.
10. Bouche P, Gherardi R, Cathala HP, Lhermitte F, Castaigne P. Peroneal muscular atrophy. Part 1. Clinical and electrophysiological study. *J Neurol Sci* 1983;61:389-399.
11. Bird TD, Ott J, Giblett ER. Evidence for linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1. *Am J Hum Genet* 1982;34:388-394.
12. Vance JM, Nicholson GA, Yamaoka LH, et al. Linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a to chromosome 17. *Exp Neurol* 1989;104:186-189.
13. Haites N, Fairweather N, Clark C, Kelly KF, Simpson S, Johnston AW. Linkage in a family with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin Genet* 1989;35:399-403.

14. Pareyson D, Marchesi C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* 2009;8:654-667.
15. Sevilla T, Jaijo T, Nauffal D, et al. Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy. *Brain* 2008;131:3051-3061.
16. Liu H, Nakagawa T, Kanematsu T, Uchida T, Tsuji S. Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J Neurochem* 1999;72:1781-1790.
17. Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, et al. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 2002;30:22-25.
18. Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, et al. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 2002;30:21-22.
19. Azzedine H, Ruberg M, Ente D, et al. Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscul Disord* 2003;13:341-346.
20. Nelis E, Erdem S, Van Den Bergh PY, et al. Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology* 2002;59:1865-1872.
21. Senderek J, Bergmann C, Ramaekers VT, et al. Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 2003;126:642-649.
22. Sevilla T, Cuesta A, Chumillas MJ, et al. Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain* 2003;126:2023-2033.
23. Marco A, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, Marin I. Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol Biol Evol* 2004;21:176-187.
24. Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is

- expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 2005;14:1087-1094.
25. Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 2005;170:1067-1078.
 26. Pedrola L, Espert A, Valdes-Sanchez T, et al. Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med* 2008;12:679-689.
 27. Wagner KM, Ruegg M, Niemann A, Suter U. Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One* 2009;4:e5160.
 28. Niemann A, Wagner KM, Ruegg M, Suter U. GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis* 2009;36:509-520.
 29. Estela A, Pla-Martin D, Sanchez-Piris M, Sesaki H, Palau F. Charcot-Marie-Tooth-related gene GDAP1 complements cell cycle delay at G2/M phase in *Saccharomyces cerevisiae* fis1 gene-defective cells. *J Biol Chem* 2011;286:36777-36786.
 30. Noack R, Frede S, Albrecht P, et al. Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum Mol Genet* 2012;21:150-162.
 31. Boldogh IR, Pon LA. Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol* 2007;17:502-510.
 32. Dagda RK, Cherra SJ, 3rd, Kulich SM, Tandon A, Park D, Chu CT. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem* 2009;284:13843-13855.
 33. Jezek P, Plecita-Hlavata L. Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1790-1804.
 34. Liu X, Hajnoczky G. Ca²⁺-dependent regulation of mitochondrial dynamics by the Miro-Milton complex. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1972-1976.
 35. Schwindling C, Quintana A, Krause E, Hoth M. Mitochondria positioning controls local calcium influx in T cells. *J Immunol* 2010;184:184-190.

36. Singaravelu K, Nelson C, Bakowski D, et al. Mitofusin 2 regulates STIM1 migration from the Ca²⁺ store to the plasma membrane in cells with depolarized mitochondria. *J Biol Chem* 2011;286:12189-12201.
37. Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 2007;76:751-780.
38. Sivera R, Espinos C, Vilchez JJ, et al. Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:334-344.
39. Schon EA, Przedborski S. Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* 2011;70:1033-1053.
40. Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzler E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:505-518.
41. Zhang Y, Chan DC. New insights into mitochondrial fusion. *FEBS Lett* 2007;581:2168-2173.
42. Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 2004;119:873-887.
43. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004;36:449-451.
44. Zuchner S, De Jonghe P, Jordanova A, et al. Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol* 2006;59:276-281.
45. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003;160:189-200.
46. Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 2001;114:867-874.
47. Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 2007;27:422-430.
48. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 2008;456:605-610.
49. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:621-633.

50. Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* 2007;356:1736-1741.
51. Cai Q, Sheng ZH. Mitochondrial transport and docking in axons. *Exp Neurol* 2009;218:257-267.
52. Perlson E, Maday S, Fu MM, Moughamian AJ, Holzbaur EL. Retrograde axonal transport: pathways to cell death? *Trends Neurosci* 2010;33:335-344.
53. Sheng ZH, Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2012;13:77-93.
54. De Vos KJ, Chapman AL, Tennant ME, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet* 2007;16:2720-2728.
55. Shi P, Strom AL, Gal J, Zhu H. Effects of ALS-related SOD1 mutants on dynein- and KIF5-mediated retrograde and anterograde axonal transport. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:707-716.
56. Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am J Pathol* 2008;173:470-482.
57. Chang DT, Rintoul GL, Pandipati S, Reynolds IJ. Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. *Neurobiol Dis* 2006;22:388-400.
58. Shankar SK. Biology of aging brain. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53:595-604.
59. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011;476:336-340.
60. Santo-Domingo J, Demaurex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797:907-912.
61. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, et al. Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:1342-1351.
62. Shen WW, Frieden M, Demaurex N. Remodelling of the endoplasmic reticulum during store-operated calcium entry. *Biol Cell* 2011;103:365-380.

63. Naghdi S, Waldeck-Weiermair M, Fertschai I, Poteser M, Graier WF, Malli R. Mitochondrial Ca²⁺ uptake and not mitochondrial motility is required for STIM1-Orai1-dependent store-operated Ca²⁺ entry. *J Cell Sci* 2010;123:2553-2564.
64. Parekh AB. Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels. *Cell Calcium* 2008;44:6-13.
65. Malli R, Naghdi S, Romanin C, Graier WF. Cytosolic Ca²⁺ prevents the subplasmalemmal clustering of STIM1: an intrinsic mechanism to avoid Ca²⁺ overload. *J Cell Sci* 2008;121:3133-3139.
66. Guo RW, Yang LX, Li MQ, Pan XH, Liu B, Deng YL. Stim1- and Orai1-mediated store-operated calcium entry is critical for angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* 2012;93:360-370.
67. Yang B, Gwozdz T, Dutko-Gwozdz J, Bolotina VM. Orai1 and Ca²⁺-independent phospholipase A2 are required for store-operated Icat-SOC current, Ca²⁺ entry, and proliferation of primary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;302:C748-756.
68. Baba Y, Kurosaki T. Impact of Ca²⁺ signaling on B cell function. *Trends Immunol* 2011;32:589-594.
69. Salmon MD, Ahluwalia J. Pharmacology of receptor operated calcium entry in human neutrophils. *Int Immunopharmacol* 2011;11:145-148.
70. Gemes G, Bangaru ML, Wu HE, et al. Store-operated Ca²⁺ entry in sensory neurons: functional role and the effect of painful nerve injury. *J Neurosci* 2011;31:3536-3549.
71. Kann O, Taubenberger N, Huchzermeyer C, et al. Muscarinic receptor activation determines the effects of store-operated Ca(2+)-entry on excitability and energy metabolism in pyramidal neurons. *Cell Calcium* 2012;51:40-50.
72. Steinbeck JA, Henke N, Opatz J, et al. Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy. *Exp Neurol* 2011;232:185-194.
73. Simmen T, Aslan JE, Blagoveshchenskaya AD, et al. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *Embo J* 2005;24:717-729.
74. Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc* 2009;4:1582-1590.

75. Iwasawa R, Mahul-Mellier AL, Datler C, Pazarentzos E, Grimm S. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *Embo J* 2011;30:556-568.
76. Schon EA, Area-Gomez E. Is Alzheimer's disease a disorder of mitochondria-associated membranes? *J Alzheimers Dis* 2010;20 Suppl 2:S281-292.
77. Tang TS, Tu H, Chan EY, et al. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* 2003;39:227-239.
78. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of Ras. *Mitochondrion* 2009;9:222-226.
79. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1983;71:741-747.
80. Encinas M, Iglesias M, Liu Y, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* 2000;75:991-1003.
81. Garcia-Perez J, Avila J, Diaz-Nido J. Implication of cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3 in the phosphorylation of microtubule-associated protein 1B in developing neuronal cells. *J Neurosci Res* 1998;52:445-452.
82. Gimenez-Cassina A, Lim F, Diaz-Nido J. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. *J Neurosci Res* 2006;84:755-767.
83. Henderson CE. Programmed cell death in the developing nervous system. *Neuron* 1996;17:579-585.
84. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:453-501.
85. Yan Q, Elliott JL, Matheson C, et al. Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo. *J Neurobiol* 1993;24:1555-1577.
86. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:381-391.
87. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;6:184-192.

88. Chong ZZ, Maiese K. Targeting WNT, protein kinase B, and mitochondrial membrane integrity to foster cellular survival in the nervous system. *Histol Histopathol* 2004;19:495-504.
89. Hur EM, Zhou FQ. GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:539-551.
90. Nishida Y, Adati N, Ozawa R, Maeda A, Sakaki Y, Takeda T. Identification and classification of genes regulated by phosphatidylinositol 3-kinase- and TRKB-mediated signalling pathways during neuronal differentiation in two subtypes of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *BMC Res Notes* 2008;1:95.
91. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142:231-255.
92. Repnik U, Turk B. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* 2010;10:662-669.
93. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008;454:455-462.
94. Bernales S, McDonald KL, Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* 2006;4:e423.
95. Kawakami T, Inagi R, Takano H, et al. Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2665-2672.
96. Kim KW, Moretti L, Mitchell LR, Jung DK, Lu B. Endoplasmic reticulum stress mediates radiation-induced autophagy by per-eIF2alpha in caspase-3/7-deficient cells. *Oncogene* 2010;29:3241-3251.
97. Matus S, Glimcher LH, Hetz C. Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23:239-252.
98. Mukherjee A, Soto C. Role of calcineurin in neurodegeneration produced by misfolded proteins and endoplasmic reticulum stress. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23:223-230.
99. Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 1983;153:163-168.
100. Yang X, Hubbard EJ, Carlson M. A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* 1992;257:680-682.

101. Ludin K, Jiang R, Carlson M. Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6245-6250.
102. Nijtmans LG, Henderson NS, Holt IJ. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 2002;26:327-334.
103. Coppi MV, Guidotti G. Intracellular localization of Na,K-ATPase alpha2 subunit mutants. *Arch Biochem Biophys* 1997;346:312-321.
104. Shprung T, Gozes I. A novel method for analyzing mitochondrial movement: inhibition by paclitaxel in a pheochromocytoma cell model. *J Mol Neurosci* 2009;37:254-262.
105. Bolte S, Cordelieres FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 2006;224:213-232.
106. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-3450.
107. Ruiz F, Alvarez G, Pereira R, et al. Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *Neuroreport* 1998;9:1277-1282.
108. Traba J, Del Arco A, Duchen MR, Szabadkai G, Satrustegui J. SCaMC-1 promotes cancer cell survival by desensitizing mitochondrial permeability transition via ATP/ADP-mediated matrix Ca(2+) buffering. *Cell Death Differ* 2012;19:650-660.
109. Vernia S, Heredia M, Criado O, et al. Laforin, a dual specificity phosphatase involved in Lafora disease, regulates insulin response and whole-body energy balance in mice. *Hum Mol Genet* 2011;20:2571-2584.
110. Vernia S, Rubio T, Heredia M, Rodriguez de Cordoba S, Sanz P. Increased endoplasmic reticulum stress and decreased proteasomal function in lafora disease models lacking the phosphatase laforin. *PLoS One* 2009;4:e5907.
111. Shield AJ, Murray TP, Board PG. Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347:859-866.
112. Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3225-3229.

113. Artal-Sanz M, Tsang WY, Willems EM, et al. The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2003;278:32091-32099.
114. Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, et al. Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet* 2003;72:722-727.
115. Roberts RC, Peden AA, Buss F, et al. Mistargeting of SH3TC2 away from the recycling endosome causes Charcot-Marie-Tooth disease type 4C. *Hum Mol Genet* 2010;19:1009-1018.
116. Chow CY, Zhang Y, Dowling JJ, et al. Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature* 2007;448:68-72.
117. Bomar JM, Benke PJ, Slattery EL, et al. Mutations in a novel gene encoding a CRAL-TRIO domain cause human Cayman ataxia and ataxia/dystonia in the jittery mouse. *Nat Genet* 2003;35:264-269.
118. Aoyama T, Hata S, Nakao T, Tanigawa Y, Oka C, Kawaichi M. Cayman ataxia protein caytaxin is transported by kinesin along neurites through binding to kinesin light chains. *J Cell Sci* 2009;122:4177-4185.
119. Darchen F, Goud B. Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie* 2000;82:375-384.
120. Opdam FJ, Kamps G, Croes H, van Bokhoven H, Ginsel LA, Fransen JA. Expression of Rab small GTPases in epithelial Caco-2 cells: Rab21 is an apically located GTP-binding protein in polarised intestinal epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 2000;79:308-316.
121. Wanschers B, van de Vorstenbosch R, Wijers M, Wieringa B, King SM, Fransen J. Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell Motil Cytoskeleton* 2008;65:183-196.
122. Hayakawa Y, Itoh M, Yamada A, Mitsuda T, Nakagawa T. Expression and localization of Cayman ataxia-related protein, Caytaxin, is regulated in a developmental- and spatial-dependent manner. *Brain Res* 2007;1129:100-109.
123. Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 2002;115:1663-1674.
124. Zorzano A, Hernandez-Alvarez MI, Palacin M, Mingrone G. Alterations in the mitochondrial regulatory pathways constituted by the

- nuclear co-factors PGC-1alpha or PGC-1beta and mitofusin 2 in skeletal muscle in type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2010;1797:1028-1033.
125. Chavis P, Fagni L, Lansman JB, Bockaert J. Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature* 1996;382:719-722.
126. Riddoch FC, Rowbotham SE, Brown AM, Redfern CP, Cheek TR. Release and sequestration of Ca²⁺ by a caffeine- and ryanodine-sensitive store in a sub-population of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cell Calcium* 2005;38:111-120.
127. Lytton J, Westlin M, Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 1991;266:17067-17071.
128. Majumder P, Trujillo CA, Lopes CG, et al. New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. *Purinergic Signal* 2007;3:317-331.
129. Putney JW. Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev* 2009;231:10-22.
130. Chiara F, Castellaro D, Marin O, et al. Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PLoS One* 2008;3:e1852.
131. Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, et al. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* 2005;42:358-365.
132. Zimon M, Baets J, Fabrizi GM, et al. Dominant GDAP1 mutations cause predominantly mild CMT phenotypes. *Neurology* 2011;77:540-548.
133. Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, et al. Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* 2009;10:145-150.
134. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:519-529.
135. Yoshida H. ER stress and diseases. *Febs J* 2007;274:630-658.
136. Thielmann Y, Weiergraber OH, Mohrluder J, Willbold D. Structural characterization of GABARAP-ligand interactions. *Mol Biosyst* 2009;5:575-579.
137. Wanschers BF, van de Vorstenbosch R, Schlager MA, et al. A role for the Rab6B Bicaudal-D1 interaction in retrograde transport in neuronal cells. *Exp Cell Res* 2007;313:3408-3420.

138. Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, et al. Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Exp Neurol* 2011;227:31-41.
139. Shioda N, Han F, Fukunaga K. Role of Akt and ERK signaling in the neurogenesis following brain ischemia. *Int Rev Neurobiol* 2009;85:375-387.
140. Parcellier A, Tintignac LA, Zhuravleva E, Hemmings BA. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal* 2008;20:21-30.
141. Hill MM, Hemmings BA. Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2002;93:243-251.
142. Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:667-672.
143. Szatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci* 1994;17:359-365.
144. Pardo B, Contreras L, Serrano A, et al. Essential role of aralar in the transduction of small Ca²⁺ signals to neuronal mitochondria. *J Biol Chem* 2006;281:1039-1047.
145. Nichols BJ, Denton RM. Towards the molecular basis for the regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Mol Cell Biochem* 1995;149-150:203-212.
146. Campanella M, Pinton P, Rizzuto R. Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in health and disease. *Biol Res* 2004;37:653-660.
147. Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, et al. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell* 2009;33:627-638.
148. Hettiarachchi NT, Parker A, Dallas ML, et al. alpha-Synuclein modulation of Ca²⁺ signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *J Neurochem* 2009;111:1192-1201.
149. Furuya Y, Lundmo P, Short AD, Gill DL, Isaacs JT. The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Res* 1994;54:6167-6175.
150. Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ, Shearman MS. The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. *Biochem J* 1995;311 (Pt 1):1-16.
151. Heizmann CW, Braun K. Changes in Ca⁽²⁺⁾-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 1992;15:259-264.

152. Saotome M, Safiulina D, Szabadkai G, et al. Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20728-20733.
153. Her LS, Goldstein LS. Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin. *J Neurosci* 2008;28:13662-13672.
154. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, et al. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 2005;307:1282-1288.
155. Zhao C, Takita J, Tanaka Y, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 2001;105:587-597.
156. Jaiswal MK, Zech WD, Goos M, et al. Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci* 2009;10:64.
157. Mattson MP. ER calcium and Alzheimer's disease: in a state of flux. *Sci Signal* 2010;3:pe10.
158. Oblinger MM, Lasek RJ. Axotomy-induced alterations in the synthesis and transport of neurofilaments and microtubules in dorsal root ganglion cells. *J Neurosci* 1988;8:1747-1758.
159. Schlaepfer WW. Structural alterations of peripheral nerve induced by the calcium ionophore A23187. *Brain Res* 1977;136:1-9.
160. Nixon RA, Quackenbush R, Vitto A. Multiple calcium-activated neutral proteinases (CANP) in mouse retinal ganglion cell neurons: specificities for endogenous neuronal substrates and comparison to purified brain CANP. *J Neurosci* 1986;6:1252-1263.
161. Schlaepfer WW, Bunge RP. Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *J Cell Biol* 1973;59:456-470.
162. Martini R, Schachner M. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 1988;106:1735-1746.

Anexo 1. Oligonucleótidos

Número de Oligo	Secuencia 5'-3'
1162	GGAAGGATCCGTATGGCTGAGAGGCACGAAGAGC (BamHI)
1163	GGAAGTCGACCTATTTTGGGGCCCTTTTCTTGGC (Sall)
1260	GGAAGAATTCATGGCTGAGAGGCAGGAAGAGC (EcoRI)
1261	GGAAGTCGACGATCTTTCATCCAGGAAAGTCTG (Sall)
1262	GGAAGAATTCACACCCAGGTTAATGCCTGATAAAG (EcoRI)
1263	GGAAGTCGACGAGATCATGGAGTCCACAGTTAAC (Sall)
1264	GGAAGAATTCCCGGCTTATGCAACTACAAGG (EcoRI)
1265	GGAAGTCGACGAATGCTGTTGGCAGCACTGCAGAGAT T (Sall)
1266	GGAAGTCGACGACTAGAAATAATTTGGTCTGGGTC (Sall)
1267	GGAAGAATTCCGGGTGGCCAAGAAAAGGG (EcoRI)
1218	CTATTCGATGATGAAGATACCCCACC
1258	GGAAGAATTCGGATGGCTGAGAGGCAGG (EcoRI)
1259	GGAAAGATCTCCTATTTTGGGCCCTTTTC (BglII)
928	GCTCCTCAGTGGATGTTGCC
1240	GGAAGAATTCGGATGAAGTTCGTGTACAAAGAA (EcoRI)

1243	GGAAAGATCTCTCACAGACCGTAGACACTTTC (BglII)
1336	GGAAGAATTCGGATGAGGGAAATCGTGACATC (EcoRI)
1337	GGAAAGATCTTTAGGCCTCCTCTTCGGCCTCC (BglII)
1399	GGAAGAATTCAAATGTCCGCAGGGGAGATTTTGG (EcoRI)
1400	GGAAAGATCTTTAGCAGGAGCAGCCGCCCTCG (BglII)
1429	GGGACACAGCTGGTctGGAGAGGTTCCG
1430	CTGCGGAACCTCTCCaGACCAGCTGTGT
1543	GGAAGTCGACATACTACCAGGTTGGGCAGACGGG (EcoRI)
1541	GGAAGCGGCCGCTCAGCAATTCAGACCCAAGCC (NotI)
1836	CAGAGCGTCGGGAAGAatTCTCTGATTACGAG
1837	ACCTCGTAATCAGAGAatTCTTCCCGACGCTC
2672	GGAAGAATTCAAATGGGGACCACCGAAGCCACGCTC C (EcoRI)
2673	GGAAAGATCTTCAGGACATGCTTGTTTCCTGATCCTT (BglII)
1802	GGAAGAATTGGGATGAGCTTCGGCTCGGAGCAC (EcoRI)
1803	GGAAAGATCTTTATATTTTTTGGCTTGAAATGG (BglII)
1955	GGAAGTCGACCATGGGGTCTCAGCATTCCGCTGC (Sall)
1956	GGAAGTCGAGTTAAATAGCTGTGGAATTTCC (XhoI)

Anexo 2. *Kernel* para deconvolucionar las imágenes de microscopía confocal.

0 0 0 -1 -1 -1 0 0 0

0 0 0 -1 0 -1 0 0 0

0 0 -1 0 1 -1 -1 0 0

-1 -1 0 4 6 4 0 -1 -1

-1 -1 0 5 7 5 0 -1 -1

-1 -1 0 4 6 4 0 -1 -1

0 0 -1 0 1 -1 -1 0 0

0 0 0 -1 0 -1 0 0 0

0 0 0 -1 -1 -1 0 0 0

Anexo 3. Listado de anticuerpos utilizados durante el desarrollo de esta tesis doctoral. WB, western blot; IP, inmunoprecipitación; IFI, inmunofluorescencia indirecta; Y2H, doble híbrido; Fr, fraccionamiento; Mc, microscopía; Dif, diferenciación; ER-Stress, estrés de retículo.

Anticuerpo (especie)	Casa comercial	Dilución	Utilidad
LexA (conejo)	abcam	WB 1:20000 ; IP 1ul	Y2H
HA (conejo y ratón)	Sigma-Aldrich	WB 1:4000 ; IFI 1:200	
c-myc (conejo)	Sigma-Aldrich	WB 1:10000 ; IP 5ul ; IFI 1:200	
c-myc (ratón)	Sigma-Aldrich	WB 1:10000; IFI 1:200	
ATPasa Complejo V (conejo)	Invitrogen	WB 1:1000	BN-PAGE
COXII (ratón)	Invitrogen	WB 1:2000	BN-PAGE
GDAP1 (mouse)	Abnova	WB 1:1000; IP 3ul	
RAB6B (conejo)	abcam	WB 1:1000	FR
B-COP (conejo)	abcam	WB 1:1000 ; IFI 1:100	FR, Mc
TOM20 (conejo)	Sigma-Aldrich	WB 1:1000 ; IFI 1:100	FR, Mc

CytC (ratón)	Zymed	WB 1:1000; IFI 1:200	FR, Mc
M6PR (ratón)	abcam	WB 1:1000 ; IFI 1:50	FR, Mc
GRP94 (conejo)	abcam	WB 1:1000 ; IFI 1:200	FR, Mc
Calreticulina (conejo)	Cell Signalling	WB 1:1000	FR
ASCL-1 (conejo)	Cell Signalling	WB 1:1000	FR
ATPasa Na⁺/K⁺ alpha 1 (ratón)	Hybridome Bank	WB 1:1000 ; IFI 1:100	FR, Mc
MAP-2 (ratón)	Sigma-Aldrich	WB 1:1000; IFI 1:100	Dif, Mc
TAU (ratón)	Sigma-Aldrich	WB 1:5000	Dif
Sinaptofisina (conejo)	Sigma-Aldrich	WB 1:1000	Dif
SNAP25 (conejo)	Sigma-Aldrich	WB 1:1000	Dif
Cdc2/cdk1 (ratón)	Abnova	WB 1:2000	Dif
AKT (conejo)	Cell Signalling	WB 1:1000	Dif
pAKT Ser473 (conejo)	Cell Signalling	WB 1:1000	Dif
pAKT Thr308 (conejo)	Cell Signalling	WB 1:1000	Dif
GSK3β (conejo)	Cell Signalling	WB 1:1000	Dif

pGSK3β	Ser9	Cell Signalling	WB 1:1000	Dif
(conejo)				
pP70 (conejo)		Cell Signalling	WB 1:1000	Dif
pP70 S6K Thr389		Cell Signalling	WB 1:1000	Dif
(conejo)				
mTOR (conejo)		Cell Signalling	WB 1:1000	Dif
pmTOR Ser2448		Cell Signalling	WB 1:1000	Dif
BIP (conejo)		Cell Signalling	WB 1:1000	ER-Stress
pEIF2 (conejo)		Cell Signalling	WB 1:1000	ER-Stress
CHOP (conejo)		Cell Signalling	WB 1:1000	ER-Stress
ERO1 (conejo)		Cell Signalling	WB 1:1000	ER-Stress
PDI (conejo)		Cell Signalling	WB 1:1000	ER-Stress
SOD2 (conejo)		Abnova	WB 1:1000	ER-Stress
pERK (conejo)		Cell Signalling	WB 1:1000	ER-Stress
Caspasa	3	Cell Signalling	WB 1:500	ER-Stress
Activada				
(conejo)				
LC-3 (conejo)		Sigma-Aldrich	WB 1:2000	ER-Stress
Actina (conejo)		Sigma-Aldrich	WB 1:4000	

ADENDUM

OBJETIVOS:

I. Establecer la biología celular y molecular de GDAP1 y su modo de acción sobre la mitocondria.

II. Determinar el mecanismo fisiopatológico que se produce en un modelo celular deficiente en GDAP1.