

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN
LA NEURODEGENERACIÓN DE
LAS NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS**

ARANZAZU BOLINCHES AMORÓS

**Dirigida por
FRANCESC PALAU MARTÍNEZ
PILAR GONZÁLEZ CABO**



PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA NEURODEGENERACIÓN DE LAS NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS

Memoria presentada por

Aranzazu Bolinches Amorós

para optar al grado de Doctora en Biología

Valencia, 2014

D. Francesc Palau Martínez, Doctor en Medicina, Investigador Senior del Programa de Enfermedades Raras y Genéticas del Centro de Investigación Príncipe Felipe, Profesor Asociado de Genética Humana de la Facultad de Medicina de Ciudad Real, UCLM, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Director Científico del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras y Dña. Pilar González Cabo, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora Acreditada del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras en el Centro de Investigación Príncipe Felipe,

CERTIFICAN:

Que Dña. Aranzazu Bolinches Amorós, licenciada en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo su codirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Papel de la mitocondria en la neurodegeneración de las neuropatías periféricas”.

Revisado el presente trabajo, expresan 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 Doctora.

En Valencia, a 15 de Julio de 2014

Prof. Dr. Francesc Palau Martínez

Dra. Pilar González Cabo

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, la autora ha disfrutado de una beca JAE Predoctoral (JAE-2009) concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

El trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos “Papel de la mitocondria en la neurodegeneración de las neuropatías periféricas hereditarias” (SAF2009-07063), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y “Consortio de Investigación Integrativa de Ataxia de Friedreich: aproximación fisiopatológica y terapéutica”, financiado por la Fundació La Marató de TV3.

AGRADECIMIENTOS

Siempre he pensado que en la vida se llega a algún punto por la casualidad de cruzarse con personas que, quizá sin darse cuenta, influyen enormemente en los caminos que uno toma. Una de esas personas en mi vida ha sido Carmen del Valle, mi profesora de Biología del colegio. A ella tengo que agradecerle que despertara mi curiosidad por conocer, por hacerme pensar y por amar la ciencia.

También un poco por casualidad llegué al Laboratorio de Genética y Medicina Molecular del IBV y ahora sé que fue una suerte para mí, no sólo en lo profesional sino también en lo personal. He tenido la oportunidad de conocer a gente increíble y puedo decir que he hecho muy buenos amigos durante estos años. A los primeros que tengo mucho que agradecer es a mis directores de Tesis, Paco y Pili. Paco, gracias por darme la oportunidad de empezar en tu laboratorio. Para mí ha sido un privilegio trabajar aquí por todo lo que he aprendido y por tenerte como jefe. Aunque creas que a veces no te escuchaba, siempre he considerado tus opiniones, críticas y consejos...y aunque me costara admitirlo, ¡al final tenías razón! Así que gracias por no dejar de escucharnos, de insistirnos en hacer las cosas bien y de inculcarnos que aunque las cosas estén bien, siempre se pueden hacer mejor. Pili, gracias por acogerme como tu *xiqueta*. Has sido una jefa estupenda desde que te sentabas conmigo en la bancada para enseñarme a hacer mis primeros experimentos chispas hasta revisando la Tesis. Muchas gracias por ser crítica, por hacer que me esforzara y por motivarme. Pero además he podido contar contigo en buenos y malos momentos, tanto dentro como fuera del labo. Te admiro mucho Pili, por todo lo que haces y lo que puedes llegar a hacer... ¡¡¡yo de mayor quiero ser como tú!!!

A Belén, este trabajo es también tuyo, porque has estado en todo el proceso enseñándome a pelearme con las células, a esforzarme, a ser organizada, motivándome, transmitiéndome truquitos de Excel, haciéndome fan del PowerPoint...y por si no tuvieras bastante con nuestros abrazos de viernes, nuestros gruñidos de lunes, nuestras clases de inglés, nuestras conversaciones a gritos en cultivos...siempre has estado dispuesta a escucharme y a consolarme cuando lo he necesitado. Mil gracias *my far* porque sin ti, esto y tantas otras cosas no habrían sido posibles.

A todos y cada uno con los que he coincidido en el laboratorio F.P.: Amalia, David y Lola, gracias por compartir tantas horas juntos dentro y fuera del labo, por nuestros viajes, por nuestros momentos paradisiacos, faranduleros, aventureros, de pimpinela, por nuestras confianzas y nuestras risas. A Vini, gracias por enseñarme a ser meticulosa, ordenada y a tomar todas las precauciones en el trabajo (¡¡¡¡al menos conmigo lo has conseguido!!!), pero también por dar vidilla al laboratorio, te aseguro que se te echaba de menos cuando no estabas. A Paula, gracias por tus ideas y consejos de trabajo, pero mucho más por tu amistad. Eres una de esas personas con las que es una suerte cruzarse por la alegría y la fuerza que transmites. Eres un ejemplo a seguir. A Anna, SuperManoli, mi pequeña saltamontes Diana, Fátima, María, Estrella, Víctor, Azahara, Estela, Susana, Franzi, Stijn, Benito, Carmina, Ibo, Janet, María Elena, Teresa, Marta, Sheila, Maribel y Rafa, con todos vosotros he compartido buenos momentos, y de todos he aprendido algo, así que gracias, porque también habéis contribuido a este trabajo.

Es normal en este trabajo que la gente considere el laboratorio como su segunda casa, por las horas que pasamos en él, y por los horarios raritos que a veces hacemos. Pero en realidad yo me he sentido en el IBV como en casa, porque no sólo he interactuado con mis vecinos de piso, sino que a base de cruzarnos con la gente por las escaleras nos acabamos conociendo todos. Por esto quiero agradecer a toda la gente con la que he coincidido en el IBV, desde el personal de administración y dirección, recepción, seguridad, limpieza (en especial a Susana), mantenimiento, informática, biblioteca, animalario y a todos los laboratorios. Y por supuesto, a la comisión de fiestas pasada y presente, por organizar todo tipo de eventos y hacer que nos conociéramos más allá de las escaleras.

Durante estos años, tan importante ha sido el apoyo que he tenido en el laboratorio como el que he encontrado fuera de él. Gracias a mis amigos que me han hecho desconectar por unas horas de ese maldito experimento que no sale, que se han interesado y esforzado por comprender mi trabajo y que me han hecho pasar muy buenos momentos. A mis biolokos y mis universitarias guapas: Ana Villalba, Fer, Carmen, CarmenGil, Aymara, Teresa, Elena, Sarah, Paquito, Ana Redón y Patri. A mis pedorros: David (sí, estás 2 veces), Irma, Maricarmen y mención especial a Salva, que sin su ayuda es muy cierto que no estaría escribiendo esta Tesis. A mis nenitas: Bea y Carla, por vuestra incondicional amistad que lo supera todo. A Elisín, por sufrir mis neuras

de trabajo y de mi vida...¿qué habría hecho yo sin ti?, gracias por ser la mejor vecina, compañera de piso, anfitriona y la mejor amiga. Y tampoco sé qué habría hecho sin los bocatas que me preparaba Robertini para afrontar la jornada laboral con energía. Sois los *very best* queridísimos.

A mi familia, en especial a mis padres que me han enseñado tanto y que me han apoyado siempre. Espero que os sintáis tan orgullosos de mí como yo lo estoy de vosotros, por vuestra actitud ante las adversidades, por vuestra fuerza y por vuestro amor incondicional. Y a mi tía Amparo, por saber cuándo necesito hablar, por tu confianza en mí y por ser para mí como una hermana mayor.

Y a ti Edu, deberías estar al principio, a mitad y al final. Porque he tenido la tremenda suerte de conocerte, de compartir pipetas contigo y tenerte como compañero de trabajo, a ti, que eres una de las personas más capaces que conozco de trabajar en investigación. Cada día me asombra más tu ilusión, tus ideas y tu forma de trabajar. Pero además he tenido la suerte de tener tu apoyo fuera del laboratorio. Tú has podido comprender mejor que nadie mis momentos malos y mis momentos eufóricos, y siempre has creído en mí. Gracias por querer compartir esta vida juntos, por cuidarme, por hacerme reír, por animarme y por hacerme tremendamente feliz.

ABREVIATURAS

- ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- ADNmt:** ADN mitocondrial.
- ARN:** ácido ribonucleico.
- ARNi:** ARN de interferencia.
- ATP:** adenosín trifosfato
- CCCP:** carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona.
- CMT:** Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.
- DCPIP:** 2,6-Diclorofenolindofenol.
- DRG:** raíces del ganglio dorsal (*dorsal root ganglia*).
- FBS:** suero bovino fetal (*fetal bovine serum*).
- FRDA:** Ataxia de Friedreich.
- InsP₃R:** receptor inositol 1,4,5-trifosfato.
- ISC:** centros de Fe/S (*iron-sulfur clusters*).
- kb:** kilobase.
- kDa:** kilodalton.
- MCU:** uniportador mitocondrial de Ca²⁺ (*mitochondrial calcium uniporter*).
- O₂⁻:** anión superóxido.
- PMA:** forbol 12-miristato 13-acetato.
- PTP:** poro de transición de permeabilidad mitocondrial (*permeability transition pore*).
- RE:** retículo endoplasmático.
- ROS:** especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*).
- RyR:** receptor de rianodina.
- SA-β-gal:** actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (*senescence-associated β-galactosidase*).
- SERCA:** ATPasa de Ca²⁺ específica de retículo sarco/endoplasmático (*sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*).
- SNC:** sistema nervioso central.
- SNP:** sistema nervioso periférico.
- SOCE:** entrada de calcio activada por el vaciado de los almacenes intracelulares (*store-operated calcium entry*).
- tBuBHQ:** 2,5-di-(ter-butil)-1,4-benzohidroquinona.
- UPR:** respuesta a proteínas desplegadas (*unfolding protein response*).
- VCM:** velocidad de conducción motora.
- X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.
- Δψ_m:** potencial de membrana mitocondrial.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Las Neuropatías Periféricas	3
2. La mitocondria.....	5
2.1. Estructura de la mitocondria	5
2.2. Funciones de la mitocondria.....	7
2.2.1. Respiración mitocondrial	7
2.2.2. Dinámica mitocondrial	9
2.2.3. Homeostasis de calcio	11
2.2.4. Apoptosis.....	14
2.3. La mitocondria en neurodegeneración	15
3. Ataxia de Friedreich.....	17
3.1. Características clínicas y neuropatología de la ataxia de Friedreich.....	17
3.2. El gen <i>FXN</i> y su patología molecular.....	19
3.3. La proteína frataxina.....	21
3.4. Función de frataxina	23
4. La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth	27
4.1. Características clínicas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.....	30
4.2. <i>GDAP1</i> , el gen responsable de <i>CMT4A</i> , <i>AR-CMT2K</i> , <i>CMT2K</i> y <i>RI-CMTA</i>	31
4.3. La proteína <i>GDAP1</i>	32
4.4. Función de <i>GDAP1</i>	33
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
1. Hipótesis.....	39
2. Objetivos.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Material biológico.....	43
1.1. Células en cultivo	43
1.1.1. <i>SH-SY5Y</i>	43
1.1.2. Fibroblastos humanos	43
1.2. Bacterias.....	44

2. Vectores.....	44
3. Anticuerpos	45
4. Generación de los modelos de silenciamiento de frataxina y de GDAP1	47
5. Análisis de proteínas.....	48
5.1. Inmunofluorescencia.....	48
5.2. Obtención de extractos proteicos totales.....	48
5.3. Obtención de extractos proteicos por fraccionamiento subcelular	49
5.4. Obtención de extractos mitocondriales	50
5.5. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas mediante <i>Western Blot</i>	50
5.5.1. Electroforesis en geles desnaturalizantes de Glicina	50
5.5.2. Electroforesis en geles desnaturalizantes de Tricina	50
6. Medidas del ciclo celular	51
6.1. Curva de crecimiento celular	51
6.2. Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo	52
6.3. Evaluación de la viabilidad celular.....	52
6.4. Ensayo de detección de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia	53
7. Parámetros bioquímicos	53
7.1. Medidas de actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial	53
7.2. Medidas de producción de ATP.....	55
7.3. Medidas de consumo de oxígeno.....	55
7.4. Medidas del potencial de membrana mitocondrial.....	56
8. Medidas de la morfología mitocondrial.....	56
9. Análisis del estrés oxidativo.....	57
9.1. Niveles de expresión de enzimas antioxidantes	57
9.2. Detección de proteínas carboniladas	58
9.3. Detección celular del anión superóxido	58
10. Análisis de apoptosis	59
11. Análisis del proceso de autofagia.....	59
11.1. Transfección de las células con el plásmido pEGFP-LC3	59
11.2. Niveles de expresión de marcadores autofágicos	59
12. Análisis del estrés de retículo endoplasmático	60
13. Medidas de calcio	60
13.1. Estudio de la homeostasis del calcio.....	60

13.2. Captación mitocondrial de calcio.....	61
14. Microscopía electrónica	62
15. Análisis estadístico	63

RESULTADOS.....65

1. Silenciamiento estable de la expresión de <i>FXN</i> y de <i>GDAP1</i>	67
2. Las células deficientes en frataxina presentan un crecimiento celular enlentecido por alteración del ciclo celular	68
3. La disminución de frataxina o de <i>GDAP1</i> no causa muerte celular	70
4. Las células deficientes en frataxina y en <i>GDAP1</i> entran en senescencia	74
5. Las alteraciones en el metabolismo energético mitocondrial son diferentes en ambos modelos de neuropatías	76
6. El déficit de frataxina afecta el potencial de membrana mitocondrial	82
7. El déficit de frataxina y el déficit de <i>GDAP1</i> causan alteraciones en la morfología mitocondrial	84
8. El déficit de frataxina y el déficit de <i>GDAP1</i> causan un aumento del estrés oxidativo celular	90
9. El déficit de frataxina y el déficit de <i>GDAP1</i> incrementan el proceso de autofagia	94
10. Alteración de la ruta mTOR en las células deficientes en frataxina ..	101
11. El déficit de frataxina y el déficit de <i>GDAP1</i> causan estrés de retículo endoplasmático.....	102
12. El déficit de frataxina y el déficit de <i>GDAP1</i> afectan la homeostasis de calcio.....	106
13. El déficit de frataxina afecta la capacidad mitocondrial de captación de calcio	110

DISCUSIÓN.....113

1. Fisiopatología celular asociada al déficit de frataxina y al déficit de <i>GDAP1</i>	116
1.1. El déficit de frataxina causa un retraso en el crecimiento celular asociado a senescencia, mientras que el déficit de <i>GDAP1</i> no afecta a la proliferación celular	116
1.2. El déficit de frataxina y el déficit de <i>GDAP1</i> causan un aumento en el estrés oxidativo celular	121

1.3. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 causan alteraciones en la morfología mitocondrial.....	127
1.4. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 causan un aumento en la autofagia basal	130
1.5. El déficit de frataxina afecta la activación de la ruta mTOR-C1 .	133
1.6. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 afectan la homeostasis de calcio y causan estrés de retículo endoplasmático	134
2. Papel de la mitocondria en la neurodegeneración.....	139
CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147

INTRODUCCIÓN

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein.

1. Las Neuropatías Periféricas.

El sistema nervioso central (SNC), formado por el encéfalo y la médula espinal, está conectado con las extremidades, estructuras motoras y sensitivas y órganos del cuerpo a través del sistema nervioso periférico (SNP). El SNP comprende los nervios craneales, las raíces nerviosas espinales, los ganglios de la raíz dorsal (DRG, *dorsal root ganglia*), los nervios espinales y el sistema periférico autónomo. Los nervios periféricos llevan información sensitiva/aférente de las distintas partes del cuerpo hacia el SNC, donde la información se procesa y se envía a través de las fibras motoras/eférentes hacia los órganos efectores motores, especialmente al músculo esquelético.

Una neuropatía es un trastorno del sistema nervioso. Cuando el daño neuronal afecta a las fibras nerviosas del SNP, se trata de una neuropatía periférica. En las neuropatías periféricas puede estar implicado un solo nervio (mononeuropatía), o bien afectar a múltiples nervios (polineuropatía). En las mononeuropatías, las lesiones producidas en nervios periféricos individuales producen síntomas localizados en función de la distribución de los nervios afectados. En las polineuropatías se da una implicación simétrica de los nervios periféricos.

Las causas que producen una neuropatía periférica incluyen diabetes, inflamación, neuropatías producidas por agentes infecciosos, exposición a sustancias neurotóxicas, defectos nutricionales y causas genéticas hereditarias.

Entre las características de las neuropatías periféricas hereditarias, pueden estar afectadas las funciones motoras y sensitivas por separado o conjuntamente. También puede darse una afectación de la función autónoma, con síntomas como alteración en la sudoración, pérdida de reflejos vasculares que producen hipotensión postural, perturbación de la función intestinal y del sistema genitourinario. Según la afectación de estas funciones, las neuropatías periféricas hereditarias se clasifican en 4 tipos: neuropatías sensitivo-motoras hereditarias (NSMH), motoras (NMH), sensitivas (NSH) y sensitivas y autonómicas hereditarias (NSAH).

En las polineuropatías, generalmente se ven afectadas las fibras nerviosas más largas, produciéndose una debilidad y pérdida muscular en los extremos distales de los miembros. Por la misma razón, la pérdida

sensitiva y los síntomas de parestesia (sensaciones anormales como hormigueo, adormecimiento o ardor) afectan a las extremidades con una distribución conocida como “guante y media”. Frecuentemente se produce la pérdida de los reflejos osteotendinosos, por pérdida de la inervación nerviosa en estructuras del huso muscular. También pueden producirse deformaciones esqueléticas, como pie cavo, dedos en garra o deformidad espinal (Thomas, 1970).

El proceso neurodegenerativo implica la destrucción o muerte progresiva de las neuronas del sistema nervioso o estructuras nerviosas (Saxena & Caroni, 2007). En algunas neuropatías periféricas la neurodegeneración produce la pérdida de fibras nerviosas, afectando característicamente a los axones más largos. Esta degeneración primaria axonal desde la periferia de la fibra nerviosa se conoce como el fenómeno de *dying back*. Ejemplos de neuropatías en las que se produce degeneración *dying back* son la atrofia muscular espinal, esclerosis lateral amiotrófica, ataxias espinocerebelosas o enfermedad de Alzheimer. La degeneración *dying back* puede implicar a los nervios periféricos sin llegar a afectar los somas celulares correspondientes, tratándose entonces de una axonopatía, o bien puede producir la pérdida de la neurona completa, incluyendo el axón y el soma celular, en el caso de una neuronopatía.

En algunas neuropatías el daño primario que causa la neurodegeneración se da en las células de Schwann, produciéndose una desmielinización segmentaria de las fibras nerviosas. En ocasiones se produce un engrosamiento nervioso por procesos de desmielinización y remielinización, dándose una proliferación concéntrica de las células de Schwann que causa formaciones características en “bulbos de cebolla”, como ocurre en algunos tipos desmielinizantes de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

La degeneración axonal asociada a enfermedades del sistema nervioso, a diferencia de la retracción axonal que se da en situaciones fisiológicas como el desarrollo neuronal, supone una pérdida del material axonal, que es eliminado por células fagocíticas como la glía o macrófagos de activación local. Además, en la degeneración axonal se produce una desestabilización del citoesqueleto celular, a diferencia de lo que ocurre en la retracción axonal, donde el citoesqueleto juega un papel activo en el proceso (Luo & O'Leary, 2005).

2. La mitocondria.

La mitocondria es un orgánulo esencial presente en todos los tipos celulares, pero de particular importancia en el sistema nervioso por llevar a cabo distintas funciones fundamentales para el proceso neuronal, como son: la producción de energía, el mantenimiento del potencial de membrana, la depuración de radicales libres, la regulación de la homeostasis de calcio, la participación en la muerte celular programada o apoptosis, el transporte axonal y dendrítico, y la liberación y reutilización de neurotransmisores en la sinapsis.

No sorprende entonces que una disfunción mitocondrial tenga consecuencias severas a nivel celular, y esté íntimamente relacionada con el proceso de envejecimiento. Pero además juega un importante papel en la progresiva muerte celular característica de algunos trastornos neurodegenerativos (Bowling & Beal, 1995). Son varias las enfermedades neurodegenerativas con una base genética conocida en las que se desconocen los mecanismos precisos de muerte neuronal, como por ejemplo, la enfermedad de Huntington, Alzheimer, Parkinson, ataxia de Friedreich, esclerosis lateral amiotrófica o algunos tipos de enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Estas enfermedades tienen una presentación clínica muy diferente y sin embargo, tienen en común una disfunción mitocondrial (Kwong *et al.*, 2006).

La mitocondria es un orgánulo de tamaño y forma variable dependiendo del tipo celular. Pueden llegar a medir hasta 10 μm y tener un diámetro de entre 0,5 y 1 μm . El número de mitocondrias presentes en una célula también varía, dependiendo de los requerimientos energéticos de la célula que las contiene.

La principal función de la mitocondria es la producción de energía celular, en forma de ATP. Pero como veremos más adelante, la mitocondria juega un papel clave en el control de otras funciones fisiológicas importantes.

2.1. Estructura de la mitocondria.

La matriz mitocondrial está rodeada por una doble membrana, distinguiéndose entre membrana mitocondrial externa e interna. El espacio contenido entre ambas membranas constituye el espacio intermembrana (**Figura 1**).

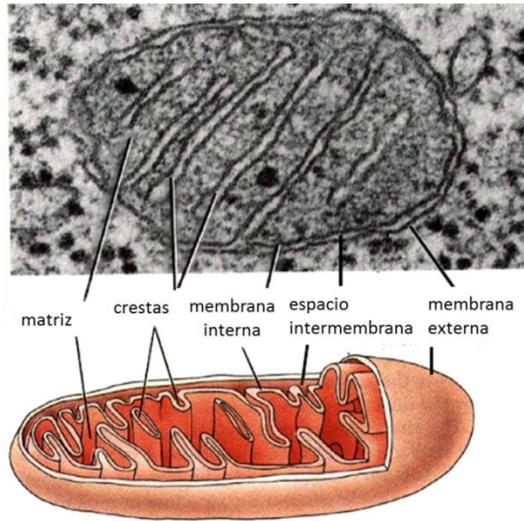


Figura 1. Estructura mitocondrial. La imagen superior muestra una fotografía de microscopía electrónica de una mitocondria, donde se aprecia su estructura: su doble membrana, las crestas mitocondriales y la matriz mitocondrial, como se esquematiza en la imagen inferior.

La membrana mitocondrial externa contiene proteínas de gran tamaño, llamadas porinas, que forman canales, haciendo a esta membrana permeable a moléculas de hasta 10 kDa. También presenta enzimas necesarios para la síntesis mitocondrial de lípidos y otros enzimas que transforman sustratos lipídicos en formas posteriormente metabolizadas en la matriz mitocondrial.

La membrana mitocondrial interna se dispone formando numerosas crestas que aumentan considerablemente su superficie. En la membrana mitocondrial interna se localizan proteínas que catalizan las reacciones redox de la cadena respiratoria, el complejo enzimático ATP sintetasa, que cataliza la producción de ATP en la matriz y proteínas específicas de transporte que regulan el paso de metabolitos hacia la matriz y hacia el exterior. Durante la respiración mitocondrial, mediante la cadena de transporte de electrones se establece un gradiente electroquímico de protones a través de esta membrana que es utilizado por la ATPasa para generar ATP, por lo que es importante que la membrana sea impermeable a la mayoría de pequeños iones.

El espacio intermembrana presenta diversos enzimas que utilizan el ATP que sale de la matriz para fosforilar otras moléculas. Contiene otras

moléculas esenciales como la carnitina, necesaria para la activación de los ácidos grasos y la entrada de éstos en la matriz mitocondrial para su posterior oxidación.

La matriz mitocondrial contiene numerosos enzimas, incluyendo los necesarios para la descarboxilación oxidativa del piruvato, la β -oxidación de los ácidos grasos y para el ciclo de Krebs. En la matriz también se encuentra el genoma mitocondrial, compuesto por moléculas de ADN mitocondrial (ADNmt). El ADNmt es una molécula circular de 16 kb que contiene 37 genes: 13 genes que codifican para subunidades proteicas de los complejos de la cadena respiratoria I, III, IV y V, 22 ARN de transferencia (ARNt) mitocondriales y 2 ARN ribosómicos (ARNr) necesarios para la expresión de los genes mitocondriales (Wallace, 1982). El resto de proteínas mitocondriales están codificadas por el genoma nuclear y son importadas a la mitocondria.

2.2. Funciones de la mitocondria.

2.2.1. Respiración mitocondrial.

La principal función de la mitocondria es la producción de energía en forma de ATP mediante la respiración mitocondrial. Este proceso metabólico utiliza la energía liberada en la oxidación de nutrientes para bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generándose un gradiente electroquímico y de pH que se usan para generar ATP a través de la fosforilación oxidativa. Este gradiente electroquímico o fuerza protón-motriz se genera a través de la cadena de transporte de electrones, donde los electrones que provienen de la oxidación de cofactores reducidos (NADH o FADH₂) son transferidos al oxígeno mientras se bombean protones a través de la membrana mitocondrial interna (**Figura 2**).

La cadena de transporte de electrones consiste en una serie de transportadores organizados en 4 complejos multiproteicos localizados en la membrana mitocondrial interna: complejo I NADH-Ubiquinona oxidoreductasa, complejo II Succinato-Coenzima Q oxidoreductasa, complejo III Coenzima Q-Citocromo *c* oxidoreductasa y el complejo IV Citocromo *c* oxidasa. Tanto el complejo I como el complejo II transfieren electrones a la ubiquinona o coenzima Q. La transferencia de electrones del complejo III al IV se realiza a través del citocromo *c*, localizado en el espacio intermembrana anclado a la membrana mitocondrial interna. Por

último, el complejo V ATP sintetasa, acopla las reacciones del transporte de electrones a la síntesis de ATP.

En condiciones fisiológicas, durante la respiración mitocondrial se pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) como subproductos nocivos, potencialmente tóxicos para la célula. Se considera que la mayoría de ROS se generan como consecuencia de la respiración mitocondrial. En varios sitios a lo largo de la cadena de transporte de electrones, los electrones procedentes de la oxidación del NADH o FADH₂ pueden reaccionar directamente con el oxígeno o con otros aceptores de electrones, generando radicales libres. Diversos trabajos han demostrado que los principales sitios de producción de ROS en la cadena de transporte de electrones son los complejos I y III (Kushnareva *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Grivennikova & Vinogradov, 2006).

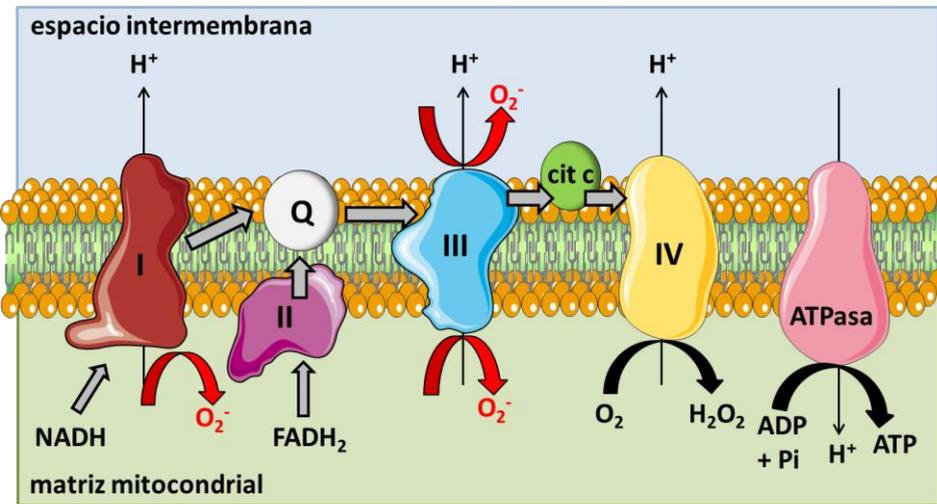


Figura 2. Cadena de transporte de electrones mitocondrial. Los electrones liberados en la reducción del NADH por parte del **complejo I NADH-Ubiquinona oxidorreductasa** son transferidos a la ubiquinona. La forma reducida ubiquinol difunde libremente por la membrana y transfiere los electrones al complejo III. Alternativamente los electrones pueden entrar a través del **complejo II Succinato-Coenzima Q oxidorreductasa** por reducción del cofactor FADH₂. El **complejo III Coenzima Q-Citocromo c oxidorreductasa** transfiere electrones al citocromo c, molécula hidrosoluble localizada en el espacio intermembrana. El **complejo IV Citocromo c oxidasa** capta electrones del citocromo c y los transfiere al oxígeno produciendo H₂O. Durante el proceso de transferencia de electrones se bombean H⁺ al espacio intermembrana, generándose un gradiente de pH y electroquímico, que es usado por la ATP sintasa del **complejo V** para generar ATP

cuando los H^+ son transportados a través de este canal hacia la matriz mitocondrial. Durante este proceso se pueden generar radicales libres como el anión superóxido (O_2^-), principalmente en los complejos I y III.

La presencia de ROS, como los iones hidroxilo (OH^-), el anión superóxido (O_2^-) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) debe estar regulada por mecanismos celulares destoxicantes, ya que pueden reaccionar con distintos componentes celulares causando un estrés oxidativo en la célula. Las ROS pueden reaccionar con los lípidos formando peróxidos lipídicos que alteran su función y además pueden reaccionar con otras moléculas que forman parte de las membranas lipídicas, afectando la integridad de las membranas celulares. También reaccionan con las proteínas, causando su oxidación e impidiendo su correcto funcionamiento (Berlett & Stadtman, 1997). Además, pueden interactuar con el ADN, siendo especialmente vulnerable el ADN mitocondrial al no estar asociado a histonas y por su proximidad a la fuente productora de ROS. Además, las mutaciones en el ADNmt debidas a ROS afectan a genes mitocondriales que funcionan en la cadena de transporte de electrones, causando una disfunción en la respiración mitocondrial que, a su vez produce una mayor cantidad de ROS, generándose un círculo vicioso (Andreyev *et al.*, 2005). Todas estas alteraciones comprometen la viabilidad celular.

2.2.2. Dinámica mitocondrial.

La mitocondria no es un orgánulo estático, sino que forma redes dinámicas que sufren procesos de fusión y fisión mitocondrial, de forma que la dinámica mitocondrial está determinada por el balance entre estos dos procesos (Chan, 2006) (**Figura 3**).

En mamíferos, la fusión mitocondrial está controlada por las proteínas mitofusinas, MFN1 y MFN2. Las mitofusinas son GTPasas localizadas en la membrana mitocondrial externa que pueden establecer interacciones homotípicas o heterotípicas facilitando la fusión de las membranas (Eura *et al.*, 2003). En la fusión mitocondrial también interviene la proteína OPA1, una GTPasa presente en el espacio intermembrana anclada a la membrana mitocondrial interna, que establece interacciones homotípicas, uniendo zonas de la membrana mitocondrial interna, y que tiene un papel clave en el control de la estructura de esta membrana (Cipolat *et al.*, 2004).

La fisión mitocondrial requiere las proteínas DRP1 y FIS1. Mientras que FIS1 es una proteína de la membrana mitocondrial externa, la proteína relacionada con las dineínas DRP1 es una GTPasa de localización citosólica, pero que se moviliza y oligomeriza en zonas puntuales de la superficie de la mitocondria, donde produce la constricción necesaria para la fisión mitocondrial (Smirnova *et al.*, 2001).

Algunas proteínas implicadas en dinámica mitocondrial pueden sufrir modificaciones postraduccionales que modulan su actividad, de forma que las células pueden ajustar el balance entre fusión y fisión mitocondrial en respuesta a cambios en la demanda energética o a estímulos ambientales (Oettinghaus *et al.*, 2012; Ranieri *et al.*, 2013).

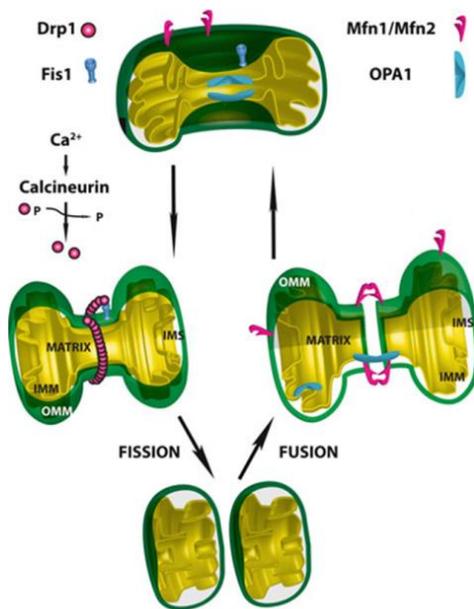


Figura 3. Maquinarias de fusión y fisión mitocondrial.

La desfosforilación de DRP1 inducida por calcio promueve su oligomerización. La cadena en espiral formada por 8-12 subunidades de DRP1 es reclutada alrededor de la mitocondria por el adaptador FIS1. La actividad GTPasa de DRP1 es necesaria para la fisión mitocondrial. La fusión de las membranas mitocondriales externa e interna implica la dimerización de MFN1 o su homólogo MFN2 y de OPA1. Sus actividades GTPasa facilitan la fusión de las dos membranas. Extraído de *Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of mitochondrial activities* (Cali *et al.*, 2012).

Existe una relación entre la morfología de la red mitocondrial y su bioenergética, de forma que una disfunción en la cadena respiratoria puede alterar la morfología de la red mitocondrial y viceversa (Nunnari & Suomalainen, 2012). Así, una perturbación en los procesos de fusión o fisión que modifican la morfología de la red mitocondrial puede inducir un fallo en la producción de energía por parte de la mitocondria (Benard *et al.*, 2007). Además, una producción excesiva de ROS por alteraciones en la cadena de transporte mitocondrial puede inducir cambios en la morfología de la red mitocondrial (Chen *et al.*, 2005). Todo esto sugiere

que la dinámica mitocondrial tiene una función protectora en la célula, facilitando la función bioenergética de la mitocondria y permitiendo la mezcla e intercambio de pequeñas moléculas, proteínas y ADNmt contribuyendo así a la capacidad cooperativa de las mitocondrias.

Los defectos en la dinámica mitocondrial repercuten en la movilidad de estos orgánulos, debido a una agregación mitocondrial anormal o a un inadecuado transporte de mitocondrias a través del citoesqueleto (Verstreken *et al.*, 2005). El transporte mitocondrial es necesario para una adecuada función celular, y es clave en células neuronales, sobre todo en las neuronas más largas en las que hay una gran distancia entre el soma celular y sus terminales nerviosos, donde se requiere un número suficiente de mitocondrias que proporcionen energía en los sitios de sinapsis. Para esto es necesario que se dé un transporte mitocondrial y unos procesos de fusión y fisión eficaces. De hecho, mutaciones en genes implicados en la dinámica mitocondrial pueden conducir a la degeneración periférica de los axones y a la muerte neuronal típica de enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (CMT) de tipo 2A y atrofia óptica dominante. Las mutaciones en *MFN2* causan la enfermedad CMT2A, una neuropatía periférica caracterizada por debilidad muscular y degradación axonal de neuronas motoras y sensitivas (Kijima *et al.*, 2005). Las mutaciones en *OPA1* causan atrofia óptica de herencia autosómica dominante, caracterizada por una pérdida progresiva de visión y degeneración del nervio óptico y células ganglionares de la retina (Alexander *et al.*, 2000).

2.2.3. Homeostasis de calcio.

La actividad celular está regulada por sistemas de señalización entre una célula con su entorno, entre células, o dentro de una célula. El sistema de señalización intracelular transforma una señal extracelular (procedente de otra célula o del medio extracelular) en una reacción celular. La señalización intercelular utiliza pequeñas moléculas, los transmisores, y hormonas, mientras que la señalización intracelular utiliza segundos mensajeros y cascadas enzimáticas reguladas por estos mensajeros. El calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero ampliamente utilizado en todos los tipos celulares. Interviene en una gran variedad de procesos celulares, como la expresión génica, la contracción muscular, la secreción, la plasticidad neuronal, la proliferación celular o la muerte celular (Clapham, 1995).

En la célula existen diversos transportadores encargados de mantener una adecuada concentración citosólica de Ca^{2+} . La ATPasa de Ca^{2+} en la membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mantienen unos bajos niveles de Ca^{2+} citosólico (~100 nM) en contra de gradiente. La entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular está regulada por diversos canales en la membrana plasmática. Dentro de la célula el calcio se almacena principalmente en el retículo endoplasmático (RE) a través de una bomba ATPasa de Ca^{2+} (SERCA). La salida de Ca^{2+} del RE se da a través de canales unidos al receptor inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3R) y al receptor rianodina (RyR). Otros orgánulos intracelulares, como la mitocondria, el aparato de Golgi, el núcleo, peroxisomas o vesículas secretoras, contribuyen a mantener unos bajos niveles de Ca^{2+} citosólico, controlando así los procesos celulares regulados por Ca^{2+} .

La mitocondria tiene un papel fundamental en la señalización mediada por Ca^{2+} . La captación mitocondrial de Ca^{2+} se da a través del uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU). El MCU tiene una expresión ubicua en mamíferos y se localiza en la membrana mitocondrial interna, donde forma un poro o canal por oligomerización (De Stefani *et al.*, 2011). El potencial negativo de la membrana mitocondrial interna generado por la cadena de transporte de electrones se usa para introducir Ca^{2+} en la matriz mitocondrial a través del MCU. De hecho, el potencial transmembrana mitocondrial es fundamental para que se dé este proceso, como se demuestra cuando, al utilizar desacopladores del potencial transmembrana, la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria queda abolida (Rizzuto *et al.*, 1992). El equilibrio electroquímico de este ion se previene por la actividad de los antiportadores de Ca^{2+} , que lo transportan fuera de la matriz mediante el intercambio de Na^+ o H^+ ; son los transportadores $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. Existe otra ruta de salida de Ca^{2+} mitocondrial, el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP). Es un canal no selectivo, de alta conductancia, que está relacionado con procesos de muerte celular, como veremos más adelante.

El MCU permite que el Ca^{2+} se acumule de forma rápida y eficaz en la mitocondria expuesta a altas concentraciones de calcio citosólico locales, cerca de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática y en el RE. Cuando aumenta la concentración de calcio local en estas zonas, la mitocondria se localiza lo suficientemente cerca como para que se active su canal de baja

afinidad por Ca^{2+} , y así acumular Ca^{2+} de manera rápida y eficaz (Figura 4).

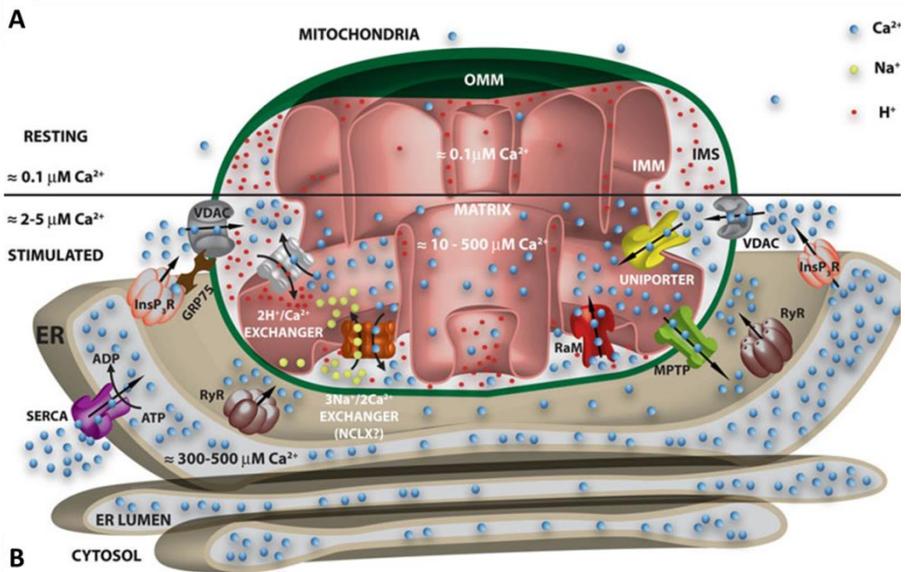


Figura 4. Homeostasis de Ca^{2+} mitocondrial en condiciones de reposo (A) y tras una estimulación que induce la apertura de los canales InsP₃R o RyR (B). El RE almacena calcio a través de la bomba SERCA y lo saca a través de los canales InsP₃R y RyR. Ante un estímulo de salida de calcio del RE, la mitocondria tampona el calcio citosólico introduciéndolo por el canal de membrana mitocondrial externa VDAC, que establece contacto con los canales InsP₃R del RE a través de la chaperona GRP75. La entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial está regulada por el uniportador de calcio mitocondrial y por el canal de captación rápida RaM. Los niveles de calcio mitocondriales se mantienen mediante los intercambiadores de Na^+ y H^+ y el poro de transición de permeabilidad mitocondrial PTP. VDAC *voltage-dependent anion channel*, RaM *rapid mode of uptake*, GRP75 *glucose-regulated protein 75*, InsP₃R *inositol 1,4,5 trisphosphate receptor*, RyR *Ryanodine receptor*, MPTP *mitochondrial permeability transition pore*, OMM *outer mitochondrial membrane*, IMS *intermembrane space*, IMM *inner mitochondrial membrane*. Adaptado de *Mitochondrial Ca^{2+} as a key regulator of mitochondrial activities* (Cali *et al.*, 2012).

Una de las funciones del calcio en la mitocondria es la activación del metabolismo mitocondrial (Pizzo *et al.*, 2012). El calcio es un activador de 3 enzimas clave en el ciclo de Krebs: piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y oxalacetato deshidrogenasa (Denton & McCormack, 1986). Mediante la estimulación del ciclo de Krebs, la mitocondria obtiene poder reductor para generar ATP a través de la respiración

mitocondrial. De hecho, un incremento en los niveles de NADH y ATP están relacionados con un aumento en el Ca^{2+} mitocondrial (Jouaville *et al.*, 1999; Duchen, 2004). De esta forma, cuando se necesita energía para determinados procesos como la contracción o la secreción celular, un aumento en el Ca^{2+} citosólico induciría la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria. La entrada de Ca^{2+} en la mitocondria activaría el metabolismo mitocondrial y se obtendría la energía necesaria para dichos procesos, adaptando así el metabolismo aeróbico a las necesidades celulares.

Además, la mitocondria tiene un importante papel modulando la actividad de los canales de calcio. La mitocondria actúa tamponando Ca^{2+} en zonas donde se encuentra en contacto con canales de liberación de Ca^{2+} . La eficaz acumulación mitocondrial de Ca^{2+} en estas zonas permite una rápida depuración de altos niveles de Ca^{2+} citosólicos, suprimiendo el efecto activador o inhibidor del calcio sobre los receptores InsP_3R y RyR (Hajnoczky *et al.*, 1999). En las neuronas, mediante este proceso, la mitocondria puede captar rápidamente calcio y liberarlo después lentamente, contribuyendo así a mantener los niveles de Ca^{2+} citosólicos, lo cual es muy importante en la transmisión sináptica. Además, la mitocondria puede modular su captación de calcio mediante la disipación del potencial de membrana, enlenteciendo la velocidad con que disminuye el Ca^{2+} citosólico y aumentando así la velocidad de propagación de las ondas de calcio (Boitier *et al.*, 1999).

La liberación de calcio por parte de mitocondrias que se encuentran cerca de canales de almacenamiento de calcio, como los del RE, contribuye a la recarga de estos orgánulos (Hoth *et al.*, 1997). Este proceso, llamado SOCE, por *store-operated calcium entry*, requiere la proximidad de la mitocondria a zonas donde el RE y la membrana plasmática están en contacto. Cuando el RE vacía sus depósitos de calcio, se activa la entrada de calcio en la célula a través de la membrana plasmática. El RE debe almacenar de nuevo calcio, localizándose en microdominios de la membrana plasmática donde se da la entrada de calcio. En estos dominios también se localizan las mitocondrias, captando el calcio rápidamente, que después liberará para cargar de nuevo el RE.

2.2.4. Apoptosis.

El proceso de muerte celular programada o apoptosis es esencial durante el desarrollo y para el normal funcionamiento de los tejidos.

Pero cuando se produce un daño grave e irreversible en la célula, se activan una serie de señales que desembocan en la muerte celular. Durante la apoptosis se producen cambios en la morfología celular como el arrugamiento de la célula, la condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, y la célula se acaba rompiendo en cuerpos apoptóticos rodeados de membrana que son fagocitados por las células de alrededor (Saraste & Pulkki, 2000).

La mitocondria tiene un papel clave en la activación de la ruta intrínseca de la apoptosis. Las señales celulares que inducen este proceso confluyen en la mitocondria: las proteínas pro-apoptóticas tienen como diana la mitocondria, causando la apertura irreversible del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, PTP. Esto produce cambios en la morfología mitocondrial y la liberación del citocromo *c*, que causa la activación de las caspasas efectoras de la muerte celular.

2.3. La mitocondria en neurodegeneración.

Dados los múltiples procesos en los que interviene la mitocondria, una disfunción mitocondrial puede producir alteraciones en la cadena de transporte de electrones, disminución en la producción de ATP, alteraciones en el balance redox celular como consecuencia de un incremento en la producción de ROS, pérdida del potencial de membrana, afectación en el tamponamiento de Ca^{2+} y defectos en la dinámica mitocondrial. Cuando los sistemas de control de calidad en la célula no consiguen contrarrestar estas alteraciones, se produce la muerte celular.

Las enfermedades mitocondriales son un grupo heterogéneo de trastornos causados por alteraciones en proteínas de localización mitocondrial que afectan a su función. Pueden estar causadas por mutaciones en el ADNmt, pero también por mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas implicadas en el correcto funcionamiento de la mitocondria. Tradicionalmente se han relacionado los defectos en la cadena respiratoria con las enfermedades mitocondriales. Sin embargo, dado el papel de la mitocondria para el correcto funcionamiento del sistema nervioso, los defectos en genes que controlan estas funciones mitocondriales son la causa de diversas enfermedades neurodegenerativas (DiMauro & Schon, 2008).

La disfunción mitocondrial ha surgido como un potencial denominador común de diversos trastornos neurodegenerativos. Las

neuropatías periféricas hereditarias como la ataxia de Friedreich y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 4A/2K son un ejemplo de degeneración neuronal. Ambas enfermedades neurodegenerativas están causadas por un déficit en proteínas codificadas en el genoma nuclear, pero con una localización mitocondrial.

3. Ataxia de Friedreich.

La ataxia de Friedreich (FRDA; MIM 229300), aunque es una enfermedad rara, es la ataxia hereditaria más frecuente en la población caucásica. De herencia autosómica recesiva, tiene una prevalencia estimada de 2/100.000, siendo en la población española de 4,7/100.000, y una frecuencia de portadores entre 1/60 y 1/100 (Polo *et al.*, 1991; Lopez-Arlandis *et al.*, 1995; Vankan, 2013).

Fue descrita por primera vez en 1863 por el patólogo alemán Nicholaus Friedreich como una atrofia degenerativa de las columnas posteriores de la médula espinal que conduce a una ataxia progresiva, pérdida sensorial y debilidad muscular, asociada con frecuencia a escoliosis, deformidad en los pies y cardiopatía (Friedreich, 1863a; b).

3.1. Características clínicas y neuropatología de la ataxia de Friedreich.

La ataxia de Friedreich clásica es de inicio precoz, generalmente antes de los 25 años de edad, y se caracteriza por una ataxia progresiva de la marcha y los miembros, disartria, ausencia de reflejo osteotendinoso, especialmente de las extremidades inferiores, reflejo de Babinski y presencia de una neuropatía axonal sensitiva con velocidades de conducción motora mayores de 40 m/s, dentro de los valores normales. Los pacientes suelen requerir silla de ruedas a los 15-20 años desde la aparición de la enfermedad. Además de la implicación neurológica, la miocardiopatía hipertrófica, presente en la mayoría de los pacientes, es la principal causa de muerte. También están asociadas una agudeza visual reducida, pérdida de audición y diabetes mellitus o intolerancia a la glucosa (Harding, 1981).

Otras variantes de ataxia de Friedreich, consideradas atípicas pero causadas por mutaciones en el mismo gen son FRDA de aparición tardía, con un inicio de la enfermedad superior a los 25 años, con una progresión más lenta y menor frecuencia de defectos esqueléticos (pie cavo y escoliosis), y FRDA con reflejos miotáticos conservados, también de aparición más tardía que en FRDA clásica y con menor incidencia de defectos esqueléticos y cardiomiopatía, además de conservar el reflejo osteotendinoso (De Michele *et al.*, 1994; Palau *et al.*, 1995).

Los cambios patológicos primarios ocurren en los ganglios de la raíz dorsal (DRG), con pérdida de las neuronas sensitivas grandes,

encargadas de la propiocepción o sentido del posicionamiento. El proceso neurodegenerativo continúa en el sistema nervioso central (SNC) con el deterioro de las columnas posteriores, los tractos espinocerebelosos y los tractos motores corticoespinales de la médula espinal, y a nivel del sistema nervioso periférico (SNP) se produce atrofia de las fibras sensitivas largas en los nervios periféricos (**Figura 5**) (Alper & Narayanan, 2003).

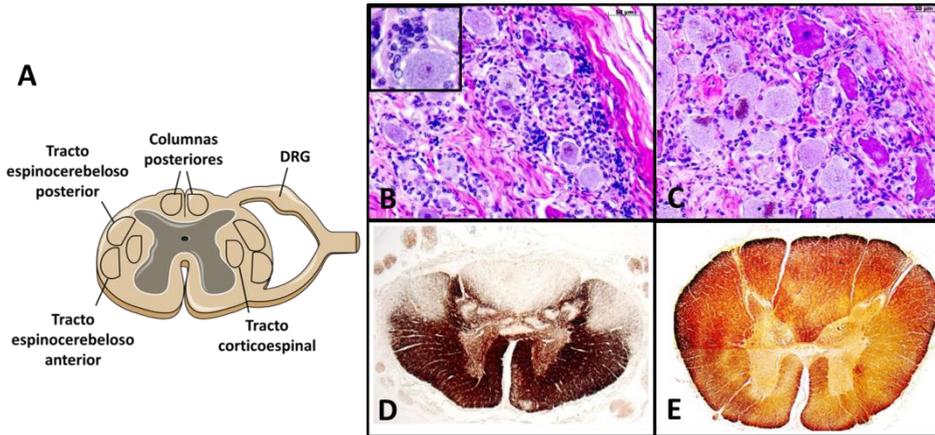


Figura 5. (A) Representación esquemática de zonas del sistema nervioso alteradas en ataxia de Friedreich (FRDA): ganglio de la raíz dorsal (DRG), columnas posteriores, tractos espinocerebelosos y corticoespinales. (B-C) Cortes histológicos de DRG a partir de necropsias de un paciente FRDA (B) y de un control sano (C). La tinción con hematoxilina-eosina muestra el menor tamaño de las neuronas del DRG, característico de FRDA (B). El mayor número de núcleos se debe a la abundancia de células satélite sobre las neuronas y en los nódulos residuales de Nageotte (magnificación en B). (D-E) Cortes histológicos de médula espinal a partir de necropsias de un paciente FRDA (D) y de un control sano (E). La detección inmunohistoquímica de la proteína mielina básica muestra la reducida sección de área en la médula espinal FRDA (D) en comparación con el control (E), y la pérdida de fibras mielinizadas en las columnas posteriores, los tractos espinocerebelosos posteriores y los tractos corticoespinales. Escala = (B, C) 50 µm; magnificación, 20 µm; (D, E) 1 mm. Adaptado de Koeppen & Mazurkiewicz (2013).

En el SNC, la columna de Clarke, constituida por un grupo de interneuronas entre las astas anterior y posterior, que intervienen en la coordinación y regulación de la actividad motora, está atrofiada, mientras que las neuronas motoras del asta anterior están intactas. En el bulbo raquídeo, los núcleos *gracilis* y *cuneatus*, donde terminan las

columnas dorsales de la médula espinal, están atrofiados, indicando una degeneración transináptica. Los tractos corticoespinales están severamente afectados en las porciones distales, sugiriendo una degeneración *dying back*. En el cerebelo, donde ocurre el procesamiento de la información propioceptiva y el ajuste de los movimientos finos, el núcleo dentado está gravemente afectado y hay pérdida de células de Purkinje. También hay una evidente pérdida de células piramidales en la corteza cerebral.

En el SNP se da una neuropatía axonal sensitiva, con pérdida de fibras largas mielinizadas, además de la pérdida selectiva de las neuronas propioceptivas de los ganglios de la raíz dorsal (Koeppen & Mazurkiewicz, 2013).

La axonopatía característica en la ataxia de Friedreich se ha asociado al mecanismo de *dying back*, que afectaría a los nervios sensitivos y a los tractos centrales espinocerebelosos y corticoespinales. Los estudios realizados en nervio sural de pacientes FRDA han revelado la pérdida predominantemente distal de fibras (Said *et al.*, 1986; Jitpimolmard *et al.*, 1993) y la participación de las células de Schwann en el proceso de hipomielinización, debido a una alteración en la comunicación entre la célula de Schwann y el axón (Morral *et al.*, 2010).

3.2. El gen *FXN* y su patología molecular.

La ataxia de Friedreich es una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *FXN* (Campuzano *et al.*, 1996), localizado en el cromosoma 9q21.11 (Chamberlain *et al.*, 1988; Hanauer *et al.*, 1990; Montermini *et al.*, 1995). Dicho gen se extiende a lo largo de 80 kb y contiene 7 exones, de los cuales los 5 primeros codifican la proteína mitocondrial frataxina.

La principal mutación patogénica es una expansión aberrante del trinucleótido guanina-adenina-adenina, GAA, localizada en una secuencia Alu en el primer intrón del gen *FXN* (Campuzano *et al.*, 1996) (**Figura 6**). Esta mutación dinámica causa una pérdida de función, ya que los niveles de la proteína frataxina están muy reducidos en los pacientes FRDA (Campuzano *et al.*, 1997). La disminución en los niveles de frataxina se explica por dos hipótesis que causan el silenciamiento del gen *FXN*: la hiperexpansión del triplete GAA induce la formación de una estructura anormal en el ADN, ADN de conformación triple o ADN adherente, *sticky DNA*, que causa un bloqueo de la transcripción

(Bidichandani *et al.*, 1998; Sakamoto *et al.*, 2001), o bien producido por la heterocromatinización de la región donde se da la expansión de la repetición (Herman *et al.*, 2006; Greene *et al.*, 2007; Soragni *et al.*, 2008; Yandim *et al.*, 2013). Ambas hipótesis no son excluyentes, ya que la formación de estructuras de triple ADN puede desencadenar la represión de su expresión mediada por heterocromatinización.

Los alelos normales pueden contener de 6 a 36 repeticiones del triplete GAA, mientras que en los alelos FRDA la hiperexpansión puede constar de 66 hasta 1700 repeticiones del triplete. Los alelos normales se clasifican en dos grupos: “alelos normales cortos”, que contienen de 6 a 10 repeticiones GAA, y “alelos normales largos”, que contienen de 12 a 36 repeticiones GAA. Los “alelos normales largos” pueden sufrir hiperexpansiones durante la replicación del ADN que causan la mutación patogénica (Cossee *et al.*, 1997; Montermini *et al.*, 1997). La expansión asociada a FRDA presenta una inestabilidad tanto mitótica como meiótica: mientras que los alelos de transmisión paterna tienden a disminuir, los alelos maternos pueden sufrir expansiones o contracciones. La variabilidad clínica observada en ataxia de Friedreich está relacionada con el tamaño de los alelos expandidos, de forma que existe una correlación inversamente proporcional entre el tamaño del alelo más corto con la edad de aparición y la severidad de la enfermedad, además de una correlación positiva con la incidencia de cardiomiopatía (Monros *et al.*, 1997).

Aproximadamente el 98% de los pacientes FRDA son homocigotos para la expansión, mientras que el resto de casos son heterocigotos compuestos para la expansión y portadores de una mutación puntual en el otro alelo que afecta a la secuencia codificante de frataxina, provocando una proteína truncada o bien causando un cambio de aminoácido que afecta a la función de la proteína (Cossee *et al.*, 1999; De Castro *et al.*, 2000).

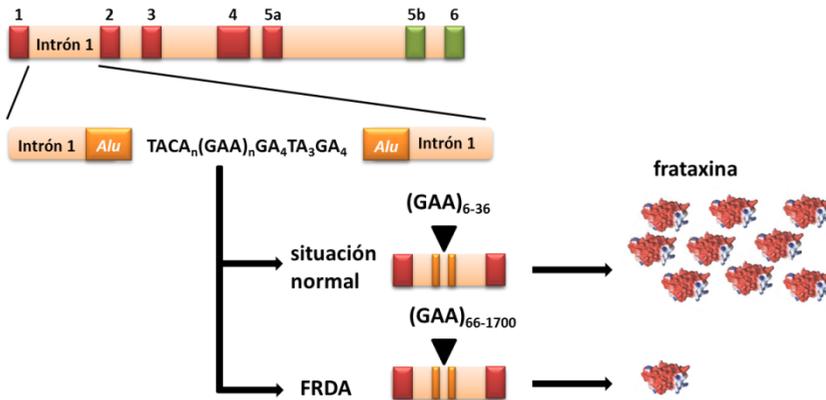


Figura 6. El gen *FXN* contiene 7 exones, de los cuales los exones 1, 2, 3, 4 y 5a, representados en rojo, codifican para la proteína frataxina. Se han descrito 2 transcritos alternativos que contienen los exones 5b y 6, representados en verde, que codifican para 2 isoformas minoritarias de menor tamaño que frataxina. El intrón 1 contiene un elemento *Alu*, en naranja, en cuya secuencia se encuentra la expansión del triplete GAA. Dicha expansión polimórfica contiene de 6 a 36 repeticiones en la población sana, mientras que en pacientes FRDA puede contener hasta 1700, lo que resulta en un bloqueo de la transcripción y una severa reducción en los niveles de frataxina.

3.3. La proteína frataxina.

El gen *FXN* codifica frataxina, una proteína de 210 aminoácidos altamente conservada en eucariotas, incluidos animales, plantas y levaduras, y en algunos procariotas (Gibson *et al.*, 1996). Frataxina es una proteína soluble de la matriz mitocondrial, asociada a la membrana interna de la mitocondria. Se sintetiza como un precursor de 210 aminoácidos y un peso molecular de 23 kDa, con una secuencia amino terminal de direccionamiento mitocondrial. Esta secuencia es eliminada en un proceso de maduración de dos pasos por la peptidasa de procesamiento mitocondrial, MPP (Koutnikova *et al.*, 1998; Cavadini *et al.*, 2000a), generando una forma intermedia de 19 kDa, correspondientes a los aminoácidos 42-210, y la forma madura de 14,2 kDa que contiene los aminoácidos 81-210 (Schmucker *et al.*, 2008).

La expresión de frataxina en humanos es alta en tejidos con un gran requerimiento energético. En el tejido nervioso adulto tiene alta expresión en la médula espinal, especialmente en DRG, menor en el cerebelo y, sorprendentemente, baja expresión en el cerebro. En tejidos

no neuronales, el mensajero de frataxina es más abundante en corazón, seguido de hígado, músculo esquelético y páncreas (Campuzano *et al.*, 1996). El patrón de expresión de frataxina coincide con los tejidos afectados en los pacientes FRDA, donde se da una reducción de más del 30% de los niveles normales de la proteína.

Frataxina es una proteína compacta y globular cuya estructura secundaria consiste en 7 hojas- β antiparalelas y 2 α -hélices enfrentadas. En la parte central de la estructura se concentran aminoácidos hidrofóbicos necesarios para la estabilización de la proteína, que están conservados entre diferentes especies. Lo mismo ocurre con un conjunto de residuos ácidos y un parche de residuos hidrofóbicos localizados en la superficie de la proteína, necesarios para la función de la proteína, y que sugieren una interacción con otras proteínas o con un ligando (**Figura 7**) (Dhe-Paganon *et al.*, 2000). La importancia de estos residuos conservados queda patente al estar alterados en muchas de las mutaciones encontradas en pacientes FRDA. Por ejemplo, las mutaciones L106S, I154F, L156P, W173G, L182H, L182F y H183R están localizadas en la parte central de frataxina, la mutación D122Y está localizada en el parche aniónico, y las mutaciones G130V, W155R y R165C están localizadas en el plano formado por las hojas β (Cossee *et al.*, 1999; De Castro *et al.*, 2000; De Michele *et al.*, 2000; Gellera *et al.*, 2007).

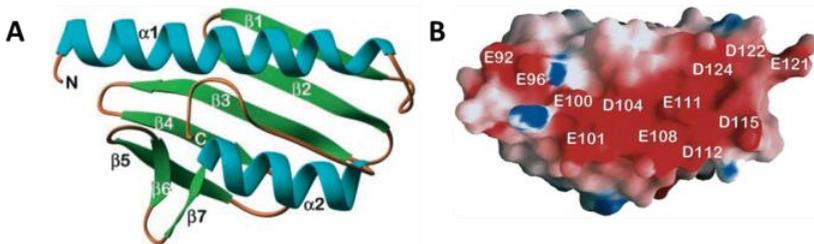


Figura 7. Estructura de frataxina. (A) La estructura secundaria de frataxina consiste en un sándwich $\alpha\beta$ compacto, con 2 α -hélices, coloreadas en azul, y 7 hojas β , en verde (A). Las cadenas β 1- β 5 forman un plano de hojas β antiparalelo que interacciona con las hélices α 1 y α 2. Una hoja β de menor tamaño se forma con las cadenas β 6 y β 7 en el extremo carboxilo terminal de la cadena β 5. (B) La representación molecular de frataxina muestra el grupo de 12 residuos ácidos conservados en la superficie de la proteína, localizados en la primera hélice y la primera hoja, que sugieren una interacción de frataxina con otra proteína o ligando. Extraído de Dhe-Paganon *et al.* (2000).

3.4. Función de frataxina.

Debido a que frataxina es una proteína mitocondrial evolutivamente conservada, el estudio de los ortólogos de frataxina en modelos de bacteria, levadura, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y ratón proporcionan una valiosa información para el estudio de la función de frataxina, además de los datos extraídos a partir de tejidos y células de pacientes FRDA.

En levadura, varios trabajos independientes en el mutante por delección del gen *YFH1* mostraron que esta cepa tenía un déficit de crecimiento en una fuente de carbono no fermentable, menor tasa de respiración, inestabilidad del ADN mitocondrial, una acumulación de hierro mitocondrial, de hasta 10 veces más que en la cepa silvestre, y una mayor sensibilidad a agentes oxidantes (Babcock *et al.*, 1997; Koutnikova *et al.*, 1997; Wilson & Roof, 1997; Radisky *et al.*, 1999). Estos trabajos, junto con la observación de una acumulación de hierro en otros modelos de déficit de frataxina como *C. elegans* (Gonzalez-Cabo *et al.*, 2011) o ratón (Puccio *et al.*, 2001), y la presencia de depósitos de hierro en pacientes FRDA (Bradley *et al.*, 2000), han sugerido que frataxina tiene un papel en la homeostasis del hierro, bien actuando como proteína de almacenaje de hierro o como una chaperona de hierro.

En la mitocondria, el hierro se usa para la síntesis de centros Fe/S (ISC, *iron-sulfur clusters*) y de grupos hemo. Los centros Fe/S son grupos prostéticos que participan en varios procesos celulares esenciales, como reacciones de transferencia de electrones. Otra característica general de las células deficientes en frataxina es el defecto en proteínas mitocondriales que contienen Fe/S, como los complejos I-III de la cadena de transporte de electrones y de las enzimas aconitasas (Rotig *et al.*, 1997; Bradley *et al.*, 2000; Muhlenhoff *et al.*, 2002). La biogénesis de ISC implica su síntesis *de novo* y su transferencia hasta la apoproteína. Durante todo el proceso intervienen proteínas chaperonas mediante interacciones proteicas. Varios estudios sitúan a frataxina en la ruta de biosíntesis de ISC, interaccionando con varios de sus componentes implicados en la síntesis *de novo*, como el complejo formado por la enzima NFS1 y la proteína de ensamblaje ISU1, pudiendo actuar como donador de hierro (Muhlenhoff *et al.*, 2002; Gerber *et al.*, 2003; Yoon & Cowan, 2003; Shan *et al.*, 2007; Schmucker *et al.*, 2011).

Siguiendo con el papel de frataxina como chaperona de hierro, se ha observado la interacción de frataxina con la enzima aconitasa en

presencia de su sustrato citrato (Bulteau *et al.*, 2004). Frataxina regularía la aconitasa en situaciones de estrés oxidativo, manteniendo el Fe biodisponible y facilitando la transferencia de Fe(II) al centro [3Fe-4S]¹⁺, reactivando la aconitasa y protegiendo el centro [4Fe-4S]²⁺ de su desensamblaje.

La síntesis de grupos hemo tiene lugar en el citosol y en la mitocondria. Diversos estudios sugieren la interacción de frataxina con la enzima ferroquelatasa, que cataliza el último paso en la síntesis de hemo, por inserción de Fe²⁺ a protoporfirina IX, pudiendo participar como donador del hierro (Lesuisse *et al.*, 2003; Yoon & Cowan, 2004). Se ha observado además, que el déficit de frataxina en células de mamíferos disminuye los niveles de metabolitos mitocondriales relacionados con grupos hemo (Schoenfeld *et al.*, 2005).

El hecho de que la cepa de levadura con delección del homólogo de frataxina no crezca en fuentes de carbono no fermentables y presente un déficit en la respiración mitocondrial, junto con la observación en muestras de pacientes FRDA de una reducción en la producción de ATP mitocondrial (Lodi *et al.*, 1999; Bradley *et al.*, 2000; Garcia-Gimenez *et al.*, 2011) sugieren un papel regulador de frataxina en la fosforilación oxidativa. En un modelo de sobreexpresión de frataxina en células de mamífero se obtuvo un aumento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) que resultaba en un elevada producción de ATP, demostrando que frataxina podía participar en la conversión de energía y fosforilación oxidativa en la mitocondria (Ristow *et al.*, 2000). Estudios posteriores en levadura, *C. elegans* y con la proteína humana han demostrado una interacción de frataxina con el complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Gonzalez-Cabo *et al.*, 2005; Vazquez-Manrique *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2007).

La mitocondria es el principal sitio donde se generan especies reactivas del oxígeno, ROS. Una alteración en la cadena de transporte de electrones mitocondrial a nivel de la incorporación de electrones tiene como consecuencia un aumento en la producción de ROS, que puede reaccionar con Fe²⁺ mediante una reacción de Fenton, originando el radical hidroxilo (OH[•]), altamente tóxico para la célula. Si a un fallo en la respiración mitocondrial se le añade una acumulación de hierro mitocondrial, como parece ocurrir ante el déficit de frataxina, la generación de un estrés oxidativo es inevitable.

La generación de diversos modelos murinos con déficit en frataxina también está siendo de gran utilidad para el estudio de la fisiopatología asociada a frataxina.

El hecho de que la ausencia total de frataxina en el modelo *knockout* de ratón causara letalidad embrionaria puso de manifiesto el papel de frataxina durante el desarrollo temprano (Cossee *et al.*, 2000). Los embriones *knockout* presentaban signos de muerte celular por apoptosis y necrosis. Dado que no se observaba una acumulación de hierro evidente durante la reabsorción embrionaria, los autores postulaban que la falta de frataxina en estos embriones podría causar un déficit de almacenes mitocondriales de hierro más que una acumulación mitocondrial de hierro, descartando esta característica como una causa primaria del déficit de frataxina.

La letalidad embrionaria del modelo de ratón *knockout* de frataxina llevó a la generación de modelos murinos viables mediante la disminución condicional de frataxina en determinados tejidos. Por ejemplo, los modelos de disminución de frataxina en neuronas y en músculo cardíaco y esquelético bajo el control de los promotores de la enolasa específica de neuronas y de la creatina quinasa muscular, respectivamente, reproducen algunas de las características observadas en pacientes FRDA. El modelo neuronal muestra un fenotipo neurológico progresivo, con ataxia y pérdida de propiocepción, y degeneración y necrosis de algunas zonas del sistema nervioso, como el núcleo dentado del cerebelo. Tanto el modelo neuronal como el modelo muscular de déficit de frataxina presentan hipertrofia cardíaca y disminución de las actividades de los complejos I-III de la cadena de transporte de electrones y aconitasas (Puccio *et al.*, 2001). Posteriormente se generaron dos modelos neuronales de inducción del déficit de frataxina en el cerebro y en el cerebelo de ratón adulto (Simon *et al.*, 2004). Estos ratones desarrollaban síntomas neurológicos progresivos y presentaban degeneración de células grandes en DRG y en las columnas posteriores de la médula espinal, además de pérdida neuronal en la columna de Clarke. Otro modelo de ratón en el que se suprimía la expresión de frataxina en las células β del páncreas presentaba una diabetes progresiva debido a la reducción de masa celular de los islotes de Langerhans (Ristow *et al.*, 2003). Esta disminución de masa estaba precedida por un aumento en la formación de ROS, en la apoptosis y en el descenso de la proliferación de células β del páncreas.

Dado que en los pacientes FRDA lo que ocurre es una disminución mantenida en los niveles de frataxina debida generalmente a la expansión del triplete GAA, en lugar de una ausencia total de la proteína, también se han generado diferentes modelos de ratón que contienen las repeticiones GAA en el gen *Fxn*. La introducción de la expansión (GAA)₂₃₀ en homocigosis en el primer intrón del gen homólogo de ratón causaba una reducción en los niveles de frataxina de alrededor del 75%, insuficiente para causar un déficit funcional (Miranda *et al.*, 2002). El cruce de estos ratones con el ratón *knockout* permitió obtener doble heterocigotos *Fxn*^{-230GAA} que, aunque tenían aproximadamente 25-30% de los niveles normales de frataxina, no presentaban un fenotipo con función neurológica o metabolismo de hierro alterados. Además, a diferencia de lo que ocurre en humanos, la expansión en el ratón era meiótica y mitóticamente estable. Sin embargo, estos ratones presentan los mismos rasgos de heterocromatinización que en los alelos expandidos de pacientes FRDA (Rai *et al.*, 2008), por lo que son un buen modelo para la evaluación de compuestos destinados a revertir los cambios epigenéticos implicados en FRDA y aumentar la expresión de la proteína. Otros modelos de ratón contienen un YAC transgénico con el gen *FXN* que incluye la expansión del triplete GAA derivada de un paciente FRDA. Dicha expansión presenta la inestabilidad intergeneracional y somática observada en pacientes de ataxia de Friedreich (Al-Mahdawi *et al.*, 2004). Estas líneas se cruzaron con el ratón *knockout* heterocigoto, obteniendo una descendencia con ausencia del gen murino y que contiene el gen humano con la expansión patogénica en su apropiado contexto genético (Al-Mahdawi *et al.*, 2006). Estos ratones expresan niveles reducidos de frataxina y un fenotipo de neurodegeneración progresiva leve, además de defectos histopatológicos y estrés oxidativo.

4. La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

En 1886 Jean-Martin Charcot y Pierre Marie, en Francia, y Howard Henry Tooth, en Inglaterra, describieron una nueva forma de atrofia muscular progresiva, de carácter familiar, inicio temprano y caracterizada por debilidad muscular y atrofia peroneal, a la que llamaron atrofia muscular peroneal. La enfermedad que hoy conocemos como enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es la patología neuromuscular hereditaria más frecuente, con una prevalencia aproximada de 17-40 afectados por cada 100.000 individuos, siendo en la población española de 28/100.000 (Combarros *et al.*, 1987; Martyn & Hughes, 1997).

La enfermedad CMT abarca un grupo heterogéneo de neuropatías periféricas hereditarias motoras y sensitivas. Clásicamente está dividida en dos grandes grupos en función de la velocidad de conducción motora (VCM) y biopsias nerviosas: CMT desmielinizante (CMT1), caracterizada por una VCM enlentecida, menor de 38 m/s, que cursa con una desmielinización nerviosa; y CMT axonal (CMT2), con VCM normal o ligeramente reducida y pérdida de axones mielinizados (Dyck & Lambert, 1968a; b). Un tercer grupo que presenta VCM en un rango intermedio, entre 30-40 m/s y en el que se puede encontrar asociada una patología nerviosa tanto axonal como desmielinizante, constituye el tipo CMT intermedio.

CMT posee una gran variabilidad genética, tanto por el número de genes y loci implicados, como por el patrón de herencia que presenta, pudiendo ser autosómico dominante, recesivo y ligado al X. Hasta la fecha se han identificado unos 50 loci y más de 40 genes asociados a la enfermedad (*Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database* <http://www.molgen.vib-ua.be/CMTMutations/Home/IPN.cfm>). Así, la clasificación actual comprende diferentes subtipos de CMT teniendo en cuenta tanto los criterios neurofisiológicos clásicos como los genes causantes y el patrón de herencia (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de CMT basada en criterios morfológicos, electrofisiológicos y genéticos.

CMT1: CMT Desmielinizante Autosómica Dominante			
Tipo	Gen	Locus	Proteína/Función
CMT1A	<i>PMP22</i>	17p12	Proteína periférica de mielina 22
CMT1B	<i>MPZ/P0</i>	1q23.3	Proteína cero de la mielina
CMT1C	<i>LITAF</i>	16p13.13	Factor alfa-TNF inducido por lipopolisacárido; posible implicación en tráfico de endosomas
CMT1D	<i>EGR2</i>	10q21.3	Factor de crecimiento temprano 2; implicado en la regulación de genes de mielina
CMT1F	<i>NEFL</i>	8p21	Cadena ligera de neurofilamento
CMT Intermedia Dominante			
Tipo	Gen	Locus	Proteína/Función
DI-CMTA	Desconocido	10q24.1-q25.1	
DI-CMTB	<i>DNM2</i>	19p13.2	Dinamina 2; GTPasa implicada en fusión/fisión de membranas
DI-CMTC	<i>YARS</i>	1p35.1	Tirosil-ARNt sintetasa
DI-CMTD	<i>MPZ/P0</i>	1q23.3	Proteína cero de la mielina
DI-CMTE	<i>INF2</i>	14q32.33	Formina; posible modulación de actina
CMT2: CMT Axonal Autosómica Dominante			
Tipo	Gen	Locus	Proteína/Función
CMT2A1	<i>KIF1B</i>	1p36.22	Kinesina; transporte de orgánulos y vesículas sinápticas
CMT2A2	<i>MFN2</i>	1p36.32	Mitofusina 2; dinámica mitocondrial
CMT2B	<i>RAB7</i>	3q21.3	RAB7; tráfico vesicular
CMT2C	<i>TRPV4</i>	12q24.1	Potencial receptor transitorio vaniloide 4
CMT2D	<i>GARS</i>	7p15	Glicil-ARNt sintetasa
CMT2E	<i>NEFL</i>	8p21	Cadena ligera de neurofilamento
CMT2F	<i>HSPB1/HSP27</i>	7q11.23	Proteína de choque térmico de 27 KDa
CMT2G	Desconocido	12q12-q13.3	
CMT2H	Desconocido	8q21.3	
CMT2I/CMT2J	<i>MPZ/P0</i>	1q23.3	Proteína cero de la mielina
CMT2K	<i>GDAP1</i>	8q21.11	GDAP1; implicada en dinámica mitocondrial
CMT2L	<i>HSPB8/HSP22</i>	12q24	Proteína de choque térmico de 22 KDa
CMT2M	<i>DNM2</i>	19p13.2	Dinamina 2; GTPasa implicada en fusión/fisión de membranas
CMT2N	<i>AARS</i>	16q22.1	Alanil-ARNt sintetasa
CMT2O	<i>DYNC1H1</i>	14q32.31	Dineína; transporte de orgánulos y vesículas sinápticas
CMT2P	<i>LRSM1</i>	9q33.3	Proteína ubiquitina E3-ligasa
	<i>MARS</i>	12q13.3	Metionil-ARNt sintetasa
	<i>MICAL1</i>	6q21	Monooxigenasa asociada a microtúbulos; regulación del citoesqueleto

CMT4: CMT Desmielinizante Autosómica Recesiva			
Tipo	Gen	Locus	Proteína/Función
CMT4A	<i>GDAP1</i>	8q21.11	GDAP1; implicada en dinámica mitocondrial
CMT4B1	<i>MTMR2</i>	11q22	Proteína relacionada con miotubularina 2; fosfatasa de fosfatidilinositoles
CMT4B2	<i>SBF2/MTMR13</i>	11p15.4	Proteína relacionada con miotubularina 13
CMT4B3	<i>SBF1/MTMR5</i>	22q13.33	Proteína relacionada con miotubularina 5
CMT4C	<i>SH3TC2</i>	5q32	Proteína implicada en tráfico vesicular y en proceso de mielinización
CMT4D	<i>NDRG1</i>	8q24.3	Posible función en diferenciación y señalización celular
CMT4F	<i>PRX</i>	19q13.2	Periaxina; mantenimiento de mielina
CMT4G	<i>HK1</i>	10q22	Hexoquinasa 1
CMT4H	<i>FGD4</i>	12p11.21	Frabina; regulación del citoesqueleto
CMT4J	<i>FIG4</i>	6q21	Fosfatasa implicada en tráfico vesicular y regulación de fosfoinositoles

CMT Intermedia Recesiva			
Tipo	Gen	Locus	Proteína/Función
RI-CMTA	<i>GDAP1</i>	8q21.11	GDAP1; dinámica mitocondrial
RI-CMTB	<i>KARS</i>	16q23.1	Lisil-ARNt sintetasa
RI-CMT	<i>PLEKHG5</i>	1p36.31	Pleckstrina; señalización celular

AR-CMT2/CMT4C: CMT Axonal Autosómica Recesiva			
Tipo	Gen	Locus	Proteína/Función
AR-CMT2A/CMT4C1	<i>LMNA</i>	1q21.2	Lamina A/C
AR-CMT2B/CMT4C3	<i>MED25</i>	19q13.3	Subunidad 25 del complejo mediador de la transcripción por la ARN polimerasa II
AR-CMT2K/CMT4C4	<i>GDAP1</i>	8q21.11	GDAP1; dinámica mitocondrial
AR-CMT2C/CMT4C2	Desconocido	8q21.3	
AR-CMT2P	<i>LRSAM1</i>	9q33.3	Proteína ubiquitina E3-ligasa
	<i>TRIM2</i>	4q31.3	Proteína ubiquitina E3-ligasa
	<i>HINT1</i>	5q31.2	Hidrolasa de interacción con nucleótidos

CMTX: CMT Ligada al X			
Tipo	Gen	Locus	Proteína/Función
CMTX1	<i>GJB1</i>	Xq13.1	Conexina 32; formación de uniones <i>gap</i> en mielina no compacta
CMTX5	<i>PRPS1</i>	Xq22.3	Fosforibosil pirofosfato sintetasa 1
CMTX6	<i>PDK3</i>	Xp22.11	Piruvato Deshidrogenasa Kinasa 3
Otras formas ligadas X (CMTX2 a CMTX4)	Desconocidos	Varios	

4.1. Características clínicas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

A pesar de la heterogeneidad genética de CMT y las diferentes funciones que realizan las proteínas implicadas, el fenotipo clínico común en la enfermedad es la consecuencia de una pérdida progresiva axonal que afecta principalmente a los nervios más largos. Los pacientes CMT presentan debilidad muscular distal, disminución o abolición del reflejo osteotendinoso, pérdida sensitiva distal leve y frecuentes deformidades esqueléticas. La atrofia muscular comienza en los miembros inferiores, dando lugar a una morfología típica de la pierna en forma de botella invertida, y a la frecuente aparición de pies cavos por afectación de los músculos de los pies. La debilidad muscular conlleva defectos en la marcha, conocida como marcha equina, en la que los pacientes CMT se ven obligados a levantar la rodilla. Conforme la enfermedad progresa, la debilidad muscular afecta también a los miembros superiores.

La edad de aparición de los síntomas, la gravedad y la velocidad de progresión de la enfermedad varían en función del tipo de CMT y el gen mutante. Generalmente, las formas autosómicas recesivas son más graves y tienen una edad de aparición más precoz que las formas dominantes. Aunque las formas recesivas suponen menos de un 10% de los casos de CMT, en poblaciones con alta prevalencia de consanguinidad, este tipo de CMT es más frecuente.

La degeneración axonal que afecta a los axones más largos es la principal causa de la enfermedad, ya sea una desmielinización o axonopatía el mecanismo patogénico subyacente. Los estudios de conducción nerviosa y las biopsias de nervio sural han ayudado a la clasificación y diagnóstico de la enfermedad. Así, una VCM menor de 38 m/s, típica de CMT1 cursa con defectos en la mielina, encargada de la rápida transmisión del impulso nervioso. De hecho, en biopsias de nervio de pacientes CMT1 desmielinizante se observan procesos de desmielinización y remielinización con estructuras típicas de bulbos de cebolla. Por el contrario, una VCM normal o ligeramente reducida cursa con defectos en el axón, viéndose considerablemente reducido el número de axones en las biopsias de nervio de pacientes con CMT2 axonal (**Figura 8**).

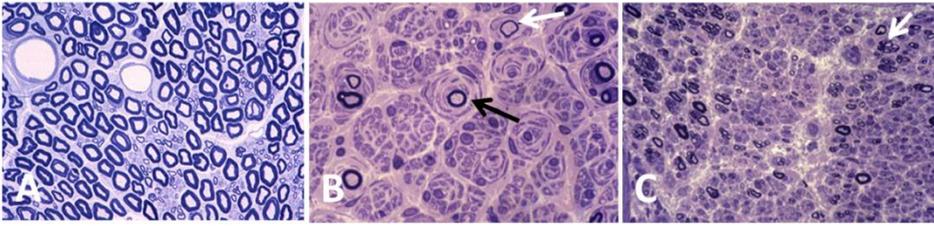


Figura 8. Biopsias de nervio. (A) Biopsia de nervio sural sano. (B) Biopsia de nervio sural de un paciente con CMT desmielinizante, donde se observa una considerable pérdida de fibras mielínicas, con proliferación de células de Schwann con formación de bulbos de cebolla (flecha negra) y remielinización (flecha blanca). (C) Biopsia de nervio ciático de un paciente con CMT axonal, donde se aprecia pérdida de fibras mielínicas gruesas y racimos de fibras en regeneración (flecha). Adaptado de *Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: revisión con énfasis en la fisiopatología del pie cavo* (Berciano *et al.*, 2011).

4.2. *GDAP1*, el gen responsable de CMT4A, AR-CMT2K, CMT2K y RI-CMTA.

Las mutaciones en el gen *GDAP1* causan CMT desmielinizante (Baxter *et al.*, 2002), axonal (Cuesta *et al.*, 2002; Claramunt *et al.*, 2005), y formas intermedias de la enfermedad (Senderek *et al.*, 2003), con una transmisión genética tanto dominante como recesiva. Así, *GDAP1* es responsable de las formas de CMT desmielinizante autosómica recesiva CMT4A (MIM 214400), CMT axonal autosómica recesiva AR-CMT2K (MIM 607706), CMT axonal autosómica dominante CMT2K (MIM 687831) y CMT intermedia autosómica recesiva RI-CMTA (MIM 608340).

GDAP1 se identificó como uno de los 10 genes que aumentaban su expresión en la línea de neuroblastoma de ratón Neuro2a al inducir su diferenciación mediante sobreexpresión de GD3 sintasa, de ahí su nombre *Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1* (Liu *et al.*, 1999).

El gen *GDAP1* se localiza en el cromosoma 8q21.11 (Ben Othmane *et al.*, 1993; Baxter *et al.*, 2002), se extiende a lo largo de aproximadamente 17 kb y contiene 6 exones, que codifican la proteína mitocondrial *GDAP1*.

Se han descrito más de 40 mutaciones en *GDAP1* que dan lugar a las distintas formas de CMT. Por lo general, las mutaciones recesivas están asociadas a formas más graves de la enfermedad, con una edad más temprana de aparición de los síntomas y una progresión más rápida.

Durante la infancia se da debilidad y deformación de los pies, con posterior afectación de las manos, que causa una incapacidad grave antes del final de la tercera década de la vida, en ocasiones incluso antes de la segunda década. En la adolescencia algunos pacientes presentan voz ronca y parálisis de las cuerdas vocales (Sevilla *et al.*, 2003). La fuerza muscular y los reflejos miotácticos están más afectados en las formas recesivas de la enfermedad. Las formas dominantes de la enfermedad suelen tener un fenotipo clínico moderado con aparición de los síntomas más tardía, o incluso asintomático, con una progresión lenta, debilidad muscular en las extremidades inferiores con afectación de la musculatura proximal en estadios tardíos de la enfermedad y sin afectación de las cuerdas vocales (Claramunt *et al.*, 2005). Los estudios histopatológicos de biopsias nerviosas de pacientes con mutaciones en *GDAP1* revelan un daño axonal primario, con pérdida de largas fibras mielinizadas, y con una desmielinización secundaria en los casos más graves de la enfermedad (Cassereau *et al.*, 2011).

4.3. La proteína GDAP1.

GDAP1 es una proteína de 358 aminoácidos que se expresa de forma ubicua, con predominio del sistema nervioso central, en cerebro, cerebelo y médula espinal, aunque también se expresa en el sistema nervioso periférico, en DRG y células de Schwann (Cuesta *et al.*, 2002; Niemann *et al.*, 2005; Pedrola *et al.*, 2008).

GDAP1 tiene una alta similitud de secuencia con proteínas glutatión S-transferasas (GST) (Cuesta *et al.*, 2002; Marco *et al.*, 2004). Sin embargo, los análisis evolutivos y estructurales demostraron que GDAP1 pertenece a una nueva clase de genes GST con una región ácida característica entre sus 2 dominios GST, el lazo $\alpha 4$ - $\alpha 5$, y 2 dominios hidrofóbicos en la región carboxilo terminal (Marco *et al.*, 2004). GDAP1 se localiza en la mitocondria (Niemann *et al.*, 2005; Pedrola *et al.*, 2005). El dominio hidrofóbico más carboxilo terminal es suficiente para su direccionamiento a la mitocondria, donde se integra en la membrana mitocondrial externa, quedando el extremo amino terminal y los dominios GST en el citosol (Wagner *et al.*, 2009) (**Figura 9**).

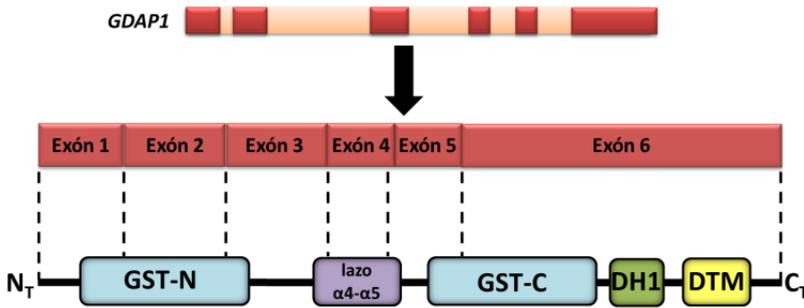


Figura 9. El gen *GDAP1* contiene 6 exones, representados en rojo, que codifican para una proteína de localización mitocondrial. La proteína **GDAP1** pertenece a la familia glutatión S-transferasa. Contiene 2 dominios GST, representados en azul, unidos por una región ácida, el lazo $\alpha 4\text{-}\alpha 5$, en morado, y 2 dominios hidrofóbicos en su región carboxilo terminal: el dominio hidrofóbico 1 (DH1) y el dominio hidrofóbico transmembrana (DTM), que contiene la secuencia de direccionamiento a mitocondria, donde se integra en su membrana externa. El extremo amino terminal y los dominios GST se localizan en el citosol.

4.4. Función de GDAP1.

En los últimos años se ha ido conociendo el papel que puede desempeñar GDAP1. La demostración de la localización mitocondrial de la proteína, y el hecho de que su sobreexpresión en células Cos-7 producía fragmentación mitocondrial hicieron pensar que GDAP1 podría tener un papel en la regulación de la red mitocondrial (Pedrola *et al.*, 2005). Posteriormente se confirmaron estos resultados, localizando GDAP1 en la membrana mitocondrial externa, e implicando a la proteína en los procesos de dinámica mitocondrial: la sobreexpresión de GDAP1 en células Cos-7 y células HeLa causaba fragmentación mitocondrial sin interferir con la fisiología de la mitocondria, ya que no producía inducción de apoptosis o reducción del potencial transmembrana (Niemann *et al.*, 2005).

Recientemente se ha observado que GDAP1 también se localiza en peroxisomas (Huber *et al.*, 2013). El silenciamiento de *Gdap1* en células N1E-115 de neuroblastoma de cerebro de ratón producía una elongación de los peroxisomas por reducción del proceso de fisión. El estudio de cómo las mutaciones en *GDAP1* afectan este proceso determinaron que las mutaciones en el dominio citosólico amino terminal sólo afectaban a la dinámica mitocondrial, mientras que las mutaciones que causan una proteína truncada en el extremo carboxilo afectaban la dinámica de las mitocondrias y de los peroxisomas.

Los estudios en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* relacionaron GDAP1 con la dinámica mitocondrial y el citoesqueleto (Estela *et al.*, 2011). Se observó que GDAP1 era capaz de complementar los defectos que presentaba el mutante *fis1Δ*, deficiente para la proteína de fisión mitocondrial FIS1 en levadura. Los defectos complementados eran un tamaño celular anormalmente aumentado, muerte celular por mayor sensibilidad a estrés oxidativo y una red mitocondrial aberrante. Además se demostró que GDAP1 y Fis1p interactuaban entre sí y con β -tubulina, postulándose el papel de GDAP1 como conector de la red mitocondrial y el citoesqueleto. Así, en las neuronas deficientes en GDAP1, en el caso de CMT asociada a mutaciones en *GDAP1*, esta conexión estaría alterada, afectándose los procesos de transporte axonal y movimiento mitocondrial.

También se ha relacionado GDAP1 con el estrés oxidativo. En un trabajo sobre el efecto de las mutaciones de *GDAP1* en la dinámica mitocondrial de células N1E-115 y células HeLa se observó que mutaciones con herencia recesiva causaban una reducción en los procesos de fisión. Por otra parte, mutaciones con herencia dominante afectaban a la fusión causando un daño mitocondrial por aumento en la producción de ROS, desequilibrio del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y mayor susceptibilidad a apoptosis (Niemann *et al.*, 2009). En un trabajo posterior se observó que *Gdap1* estaba sobreexpresado en una línea neuronal de ratón HT22 seleccionada por su resistencia a estrés oxidativo (Noack *et al.*, 2012). La sobreexpresión de GDAP1 protegía a las células de la disminución en los niveles de la molécula antioxidante glutatión, GSH, y de la disipación del $\Delta\psi_m$ que producía la activación de la muerte celular. La sobreexpresión de GDAP1 causaba una disminución en la actividad de la cadena respiratoria, en la producción de anión superóxido (O_2^-) y en la captación mitocondrial de Ca^{2+} , de forma que el $\Delta\psi_m$ se mantenía elevado, protegiendo a las células de la apoptosis mediada por estrés oxidativo.

Recientemente se ha demostrado cómo el déficit de GDAP1 en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y afecta a la homeostasis de calcio (Pla-Martin *et al.*, 2013). En concreto, la disminución en los niveles de GDAP1 afectaba al proceso de SOCE (*store-operated calcium entry*) disminuyendo la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria tras el vaciado de los depósitos de calcio en el retículo endoplasmático (RE). La actividad SOCE no se veía reducida en este modelo por afectación en la captación

de Ca^{2+} en mitocondrias aisladas ni por parte del RE, sino por una alteración en la distribución y motilidad mitocondrial hacia dominios del subplasmalema tras el vaciado de Ca^{2+} del RE y la posterior activación de la entrada celular de Ca^{2+} . En este trabajo, además, se confirmó la interacción de GDAP1 con β -tubulina y con las proteínas relacionadas con tráfico vesicular RAB6B y caytaxina, implicadas respectivamente en transporte retrógrado y anterógrado. Por otra parte, el silenciamiento de *GDAP1* afectaba la interconectividad mitocondrial y la yuxtaposición de la mitocondria con el RE, disminuyendo estos contactos. Dados estos resultados, los autores de este trabajo propusieron a GDAP1 como una proteína adaptadora de la red mitocondrial, regulando su correcta distribución e interacción con otros componentes celulares, como el RE (Pla-Martin *et al.*, 2013).

Queda patente que mutaciones en GDAP1 afectan al correcto funcionamiento de la mitocondria, orgánulo esencial en células con un alto requerimiento energético, como son las neuronas. La mitocondria proporciona energía tanto a los axones como a las células de Schwann. La interacción de axones y células de Schwann es necesaria para el correcto desarrollo y mantenimiento de los nervios periféricos mielinizados, de forma que fallos en el axón producen fallos en las células de Schwann y viceversa. Así, las mutaciones que alteran la función de GDAP1 afectan procesos esenciales como son la dinámica mitocondrial, el transporte axonal o el metabolismo de calcio, comprometiendo el correcto funcionamiento neuronal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

*“Si como explorador hubiera sabido lo que iba a encontrar, no hubiera ido.
Del mismo modo, el científico se aventura en la célula,
el átomo o el cosmos sin saber lo que le espera.”*

Jacques Cousteau.

La disfunción mitocondrial ha surgido como un denominador común de diversos trastornos neurodegenerativos. La investigación de trastornos mendelianos raros es una vía para comprender los mecanismos subyacentes de las enfermedades neurodegenerativas y el papel de las mitocondrias en la patología celular. El estudio de la afectación de procesos mitocondriales en situaciones de déficit de proteínas codificadas en el genoma nuclear que realizan su función en la mitocondria nos permite establecer un paradigma del papel de la mitocondria en el contexto de enfermedades mendelianas humanas.

En este trabajo nos centraremos en investigar los mecanismos patogénicos que conducen a la degeneración neuronal de diferentes, pero relacionadas, neuropatías periféricas hereditarias: ataxia de Friedreich (FRDA) y Charcot-Marie-Tooth (CMT) tipo 4A/2K. Ambas enfermedades son neurodegenerativas y muestran una neuropatía axonal periférica como su mayor característica. Y ambas están causadas por un déficit en proteínas mitocondriales: frataxina en el caso de FRDA y GDAP1 en CMT4A/2K. Para esto, nos proponemos determinar las consecuencias fisiopatológicas del déficit de frataxina y de GDAP1 en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, analizando la alteración en los procesos mitocondriales y moleculares involucrados en ambas enfermedades.

1. Hipótesis.

En base a la diferente biología mitocondrial de frataxina y de GDAP1 y la distinta neuropatología que se asocia a FRDA y CMT4A/2K, planteamos la hipótesis de que los mecanismos que determinan la neurodegeneración son distintos para cada una de estas enfermedades.

2. Objetivos.

El objetivo de este trabajo es el estudio de los mecanismos de degeneración en dos modelos neuronales de enfermedades neurodegenerativas: FRDA y CMT4A/2K. La correcta caracterización de ambos modelos nos permitirá relacionar distintos procesos mitocondriales y celulares cuya alteración desencadena una neurodegeneración.

Objetivo 1. Estudio comparativo de procesos mitocondriales en el contexto de déficit de frataxina y de GDAP1:

- 1.1. Producción de energía.
- 1.2. Producción de estrés oxidativo.
- 1.3. Dinámica de la red mitocondrial.
- 1.4. Comunicación de la mitocondria con el retículo endoplasmático.
- 1.5. Homeostasis de calcio.

Objetivo 2. Estudio comparativo de procesos celulares en el contexto de déficit de frataxina y de GDAP1:

- 2.1. Crecimiento celular.
- 2.2. Senescencia celular.
- 2.3. Apoptosis.
- 2.4. Autofagia.

MATERIALES Y MÉTODOS

“La ciencia es una magia que funciona.”

Kurt Vonnegut

1. Material biológico.

1.1. Células en cultivo.

Durante este trabajo hemos empleado 2 tipos de líneas celulares: SH-SY5Y y fibroblastos humanos.

1.1.1. SH-SY5Y.

La línea celular SH-SY5Y deriva de la línea de neuroblastoma humano SK-N-SH, obtenida en 1978 (Biedler *et al.*, 1978). Esta línea de neuroblastoma procede de un tumor embrionario derivado de células precursoras del SNP. La línea SH-SY5Y es por tanto un buen modelo para el estudio de las enfermedades de ataxia de Friedreich y CMT4A/2K, ya que tiene su origen en las células de la cresta neural, al igual que las células del ganglio dorsal afectadas en estas enfermedades.

Las células SH-SY5Y se crecieron en medio DMEM-F12 suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina 100 mg/mL (Gibco, Invitrogen), a 37°C en una atmósfera con CO₂ 5% y O₂ 20%.

1.1.2. Fibroblastos humanos.

Ocasionalmente en este trabajo hemos utilizado fibroblastos que procedían de biopsias de pacientes de ataxia de Friedreich y fibroblastos humanos sanos obtenidos del repositorio celular Coriell (Candem, USA). Las características de cada línea se muestran en la **Tabla 2**.

Los fibroblastos se crecieron en medio DMEM suplementado con FBS inactivado 15%, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina 100 mg/mL (Gibco, Invitrogen), a 37°C en una atmósfera con CO₂ 5% y O₂ 20%.

Tabla 2. Caracterización e identificación de las líneas celulares de fibroblastos FRDA y controles. La tabla muestra información sobre la edad, sexo y características clínicas de los individuos a partir de los cuales se obtuvieron los fibroblastos empleados en el trabajo. Se muestra además el número de repeticiones del triplete GAA del primer intrón del gen *FXN* presente en ambos alelos de todas las muestras. *El Control 3 fue cedido por la Dra. Del Río, del CIEMAT (Madrid).

Nombre	Código	Repeticiones GAA	Aspectos clínicos	Edad al realizar la biopsia	Sexo	Edad estimada de aparición de la enfermedad
FRDA 1	GM04078	370/470	Ataxia, neuropatía periférica, cardiomiopatía.	30	Hombre	25
FRDA 2	GM03816	350/470	Degeneración espinocerebelosa, cardiomiopatía.	36	Mujer	25
FRDA 3	GM03665	780/780	Ataxia de la marcha y de los miembros, escoliosis, pérdida sensitiva propioceptiva	13	Mujer	8
Control 1	GM08402	10/10	Sujeto aparentemente sano.	32	Hombre	-
Control 2	GM01652	8/8	Sujeto aparentemente sano.	11	Mujer	-
Control 3	*	10/10	Sujeto aparentemente sano.	50	Mujer	-

1.2. Bacterias.

La cepa bacteriana utilizada en este trabajo ha sido DH5 α , de *Escherichia coli*, utilizada para la replicación y obtención del plásmido pEGFP-LC3. La cepa DH5 α [genotipo *F'**endA1 hsdR17 (rK- mK+)* *glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ (LacIZYA-argF) U169 deoR (Φ 80*dlac* Δ (*lacZ*)M15]* se creció en medio completo LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L) a 37°C en sólido o líquido. El medio se suplementó con kanamicina 50 μ g/ μ L una vez transformadas las bacterias por electroporación con el plásmido pEGFP-LC3 para seleccionar las portadoras del plásmido que confiere resistencia a este antibiótico.

2. Vectores.

El vector plasmídico pEGFP-LC3 fue cedido por el Dr. Erwin Knecht, del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia). Esta construcción

contiene el gen *LC3* clonado entre los sitios de restricción *Bgl* II y *Eco*R I del sitio de clonaje múltiple del vector pEGFP-C1. Este vector codifica una variante mejorada de la proteína verde fluorescente GFP y en su extremo carboxilo terminal la proteína de interés. En la **Figura 10** se muestra el plásmido pEGFP-C1.

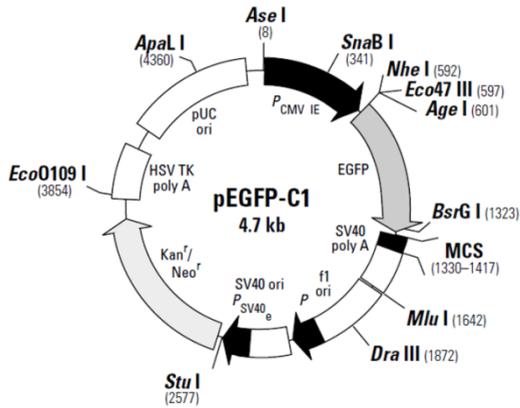


Figura 10. Vector de clonación pEGFP-C1. Es un vector de expresión de células de mamífero en el que se pueden fusionar proteínas en su extremo amino terminal con GFP. Kan^r, gen de resistencia a Kanamicina; EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente mejorada; MCS, *Multicloning site*, sitio de clonaje múltiple.

3. Anticuerpos.

En la **Tabla 3** se muestran las soluciones de bloqueo empleadas para la incubación de anticuerpos primarios usados en las técnicas de Inmunofluorescencia y *Western Blot*. La **Tabla 4** recoge los anticuerpos empleados en este trabajo.

Tabla 3. Soluciones de bloqueo empleadas.

Solución de bloqueo	Composición
Bloqueo I	Seroalbúmina bovina 3% en PBS 1X
Bloqueo II	Leche desnatada en polvo 5%, suero bovino fetal 10%, seroalbúmina bovina 0,5%, Tritón X-100 0,1% en PBS 1X
Bloqueo III	Suero de caballo 5% en PBS 1X
Bloqueo IV	Leche desnatada en polvo 5% en TBS-T [Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v)]
Bloqueo V	Seroalbúmina bovina 5% en TBS-T [Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v)]

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados. Se muestran las características de los anticuerpos primarios usados y las condiciones en las que se han utilizado, tanto para *Western Blot* (WB) como para Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Anticuerpo	Origen	Casa comercial	Dilución
Anti-actina	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich	1:4000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-Bax	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotech	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-Bcl2	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotech	1:500 en Bloqueo IV (WB)
Anti-BIP	Monoclonal de conejo	Cell Signaling	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-caspasa 3 procesada (Asp175)	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-catalasa	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-catepsina D	Monoclonal de ratón	Abcam	1:100 en Bloqueo II (IFI)
Anti-citocromo c	Monoclonal de ratón	Zymed	1:500 en Bloqueo III (IFI)
	Monoclonal de ratón	BD Biosciences	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-COX I	Monoclonal de ratón	MitoSciences	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-COX II	Monoclonal de ratón	Invitrogen	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-CuZnSOD	Policlonal de conejo	Stressgen	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-frataxina	Monoclonal de ratón	Inmunological Sciences	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-GDAP1	Policlonal de ratón	Abnova	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-LC3B-II	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-MnSOD	Monoclonal de ratón	Stressgen	1:2000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-mTOR	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1:500 en Bloqueo IV (WB)
Anti-mTOR (fosfo S2448)	Policlonal de conejo	Abcam	1:500 en Bloqueo V (WB)
Anti-Opa-1	Monoclonal de ratón	BD Biosciences	1:500 en Bloqueo IV (WB)
Anti-p70S6K	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1:500 en Bloqueo IV (WB)
Anti-p70S6K (fosfo Thr389)	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1:500 en Bloqueo V (WB)
Anti-RPS6	Policlonal de conejo	Abcam	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti-RPS6 (fosfo S235+S236)	Policlonal de conejo	Abcam	1:1000 en Bloqueo V (WB)
Anti-SQSTM1 / p62	Monoclonal de ratón	Abcam	1:1000 en Bloqueo IV (WB)
Anti- β tubulina	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1:1000 en Bloqueo IV (WB)

4. Generación de los modelos de silenciamiento de frataxina y GDAP1.

En este trabajo se han utilizado dos modelos de silenciamiento de frataxina y de GDAP1 por interferencia de ARN (ARNi) generados previamente en el laboratorio. Las células SH-SY5Y se transfectaron con el vector pLKO.1 (*MISSION® shRNA Plasmid DNA*, Sigma-Aldrich) que contenía secuencias para la formación de horquillas complementarias a secuencias del gen *FXN* o de *GDAP1* (**Tabla 5**). También se transfectaron las células con un plásmido control cuyo ARN en horquilla codificante no era complementario con ningún gen humano. Las transfecciones se realizaron usando el kit *SuperFect Transfection* (Qiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron y se mantuvieron en medio DMEM-F12 suplementado con FBS 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina 100 mg/mL (Gibco, Invitrogen), a 37°C en una atmósfera con CO₂ 5%. Para mantener la selección, los clones transfectados de manera estable se mantuvieron con puromicina 2 µg/mL.

Además de la línea original SH-SY5Y también usamos como control la línea pLKO.1-NT, transfectada con el ARNi no dirigido. Para cada modelo de silenciamiento disponíamos de 2 líneas celulares. Para el modelo de silenciamiento de frataxina, las líneas FXN-138.1 y FXN-138.2, que poseían una reducción en los niveles de la proteína frataxina del 82% y del 78% respectivamente, con respecto a la línea control pLKO.1-NT. Para el modelo de silenciamiento de GDAP1, las líneas GDAP1-G1 y GDAP1-G4, que poseían una reducción en los niveles de la proteína GDAP1 del 40% y del 60% respectivamente, con respecto al control pLKO.1-NT.

Tabla 5. Secuencias de interferencia codificadas por los plásmidos pLKO.1-siRNA frente a los ARN mensajeros de los genes *FXN* y *GDAP1*.

Plásmido pLKO.1-siRNA	Gen diana	Secuencia de interferencia	Clon
TRCN0000006138	<i>FXN</i>	CCGGGCTGGACTCTTTAGCAGAGTTCTCG AGAACTCTGCTAAAGAGTCCAGCTTTT	FXN-138.1 y FXN-138.2
TRCN0000118971	<i>GDAP1</i>	CCGGGCCTATACACATGGCTGCATTCTCG AGAATGCAGCCATGTGTATAGGCTTTT	GDAP1-G1
TRCN0000118969	<i>GDAP1</i>	CCGGGCCACTCAGATCATTGATTATCTCG AGATAATCAATGATCTGAGTGGCTTTT	GDAP1-G4

5. Análisis de proteínas.

5.1. Inmunofluorescencia.

Para la detección de proteínas en células en cultivo se sembraron 200.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos sobre cubres de vidrio de 13 mm de diámetro. Tras 24 horas en cultivo se realizó la fijación de las células con Formaldehído 2% en medio de cultivo durante 10 minutos a 37°C seguida de Formaldehído 4% en medio de cultivo durante 10 minutos a 37°C. Tras 3 lavados con PBS 1X, la fijación se bloqueó con Glicina 10 mM pH 8,5 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,5% en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados rápidos con PBS 1X, los cubres se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (ver **Tabla 3**), previo a la incubación con el anticuerpo primario diluido en el apropiado tampón de bloqueo (ver **Tabla 4**) a 4°C durante toda la noche. Tras 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X, los cubres se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo, diluido en el adecuado tampón de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X, los cubres se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje Aqua-Poly/Mount (Polysciences).

Para la visualización de vesículas LC3 positivas en células transfectadas con el plásmido pEGFP-LC3, después de la fijación únicamente se incubó con DAPI, debido a la capacidad de GFP de emitir fluorescencia.

Las imágenes se digitalizaron con una cámara Hamamatsu conectada a un microscopio Leica DMR.

5.2. Obtención de extractos proteicos totales.

Para la obtención de extractos proteicos totales, cuando las células estaban a aproximadamente un 90% de confluencia, se levantaron con tripsina y se recogieron en medio completo DMEM-F12. Se centrifugaron a 100 g durante 5 minutos y los *pellets* se resuspendieron en tampón de lisis [Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 10 mM, EDTA 50 mM pH 8,0, nonidet 5 mM, Glicerol 15% (v/v) e inhibidores de proteasas (Roche)].

Tras 30 minutos de incubación en hielo, los lisados celulares se sometieron a 3 ciclos sucesivos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37°C. Posteriormente los lisados se centrifugaron a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contenía el lisado celular, se cuantificó con el reactivo de Bradford (Bio-Rad).

Para la obtención de los extractos proteicos totales sobre los que se testaron marcadores autofágicos y proteínas de la ruta de señalización mTOR, las células se recogieron mediante raspado en tampón de lisis celular RIPA [Tris-HCl 50 mM pH 6,8, NaCl 150 mM, desoxicolato sódico 0,5% (p/v), SDS 0,1% (p/v), Tritón X-100 1% (v/v) e inhibidores de proteasas (Roche)] y fueron incubadas durante 5 minutos a 4°C en agitación. A continuación se centrifugaron a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contenía el lisado celular, fue cuantificado con el reactivo de Bradford (Bio-Rad).

5.3. Obtención de extractos proteicos por fraccionamiento subcelular.

Con el fin de obtener extractos proteicos de distintos compartimentos celulares, empleamos el protocolo de fraccionamiento subcelular descrito por Wang y colaboradores (Wang *et al.*, 2006). Cuando las células se encontraban a aproximadamente un 90% de confluencia, se levantaron con tripsina y se recogieron en el medio de cultivo completo. Se centrifugaron a 100 g durante 5 minutos y los *pellets* se resuspendieron en 5 volúmenes de tampón isotónico [HEPES-KOH 10 mM pH 7,5, manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 1 mM e inhibidores de proteasas (Roche)] y se incubaron durante 15 minutos a 4°C. Las células se rompieron mecánicamente pasándolas por aguja hipodérmica de 21G 10 veces. Este lisado se centrifugó a 700 g durante 10 minutos a 4°C, para precipitar membranas y núcleos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos a 4°C. El *pellet*, que contenía la fracción mitocondrial, se resuspendió en tampón de lisis [Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Glicerol 10% (v/v), Tritón X-100 1% (v/v), PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas (Roche)]. El sobrenadante se centrifugó a 100.000 g durante 1 hora a 4°C en una ultracentrífuga Beckman Coulter en tubos de policarbonato. El sobrenadante obtenido tras esta centrifugación contenía la fracción citosólica.

5.4. Obtención de extractos mitocondriales.

Para la obtención de extractos mitocondriales, las células fueron sembradas en 6 placas de 15 cm de diámetro por clon, hasta alcanzar una confluencia del 80-90%. Las células se levantaron con tripsina y se recogieron en medio completo DMEM-F12. Los extractos mitocondriales se obtuvieron usando el kit *Mitochondrial Isolation MITOISO2* (Sigma-Aldrich) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El *pellet* obtenido, que contenía la fracción mitocondrial, fue resuspendido en 75-100 μ L de tampón de almacenaje. Esta solución se cuantificó con el reactivo de Bradford (Bio-Rad) y se usó para realizar las medidas de actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y/o la inmunodetección por *Western Blot* de algunas de las proteínas mitocondriales analizadas en este trabajo.

5.5. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas mediante *Western Blot*.

La inmunodetección mediante *Western Blot* se realizó en geles desnaturalizantes de Glicina o de Tricina a diferentes porcentajes de poliacrilamida (10-15%).

5.5.1. Electroforesis en geles desnaturalizantes de Glicina.

Los extractos proteicos se resuspendieron en tampón de carga de proteínas 5X [Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,5% (p/v), glicerol 50% (v/v) y DTT 500 mM]. Las proteínas se desnaturalizaron hirviendo las muestras durante 5 minutos antes de cargarlas en un sistema de electroforesis *Miniprotein Electroforesis System* (BioRad). La primera fase de entrada y concentración de las muestras en el gel se realizó a un voltaje constante de 120 V. La segunda fase de separación de las proteínas se realizó a un voltaje constante de 200 V. La electroforesis se realizó en un tampón Tris-Glicina [Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v)].

5.5.2. Electroforesis en geles desnaturalizantes de Tricina.

Los extractos proteicos se resuspendieron en tampón de carga de proteínas 5X [Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 10% (p/v), *Serva Blue G* 0,025% (p/v), glicerol 30% (v/v) y β -mercaptoetanol 0,1% (v/v)]. Las

proteínas se desnaturalizaron hirviendo las muestras durante 5 minutos antes de cargarlas en un sistema de electroforesis *Miniprotein Electroforesis System* (BioRad). La primera fase de entrada y concentración de las muestras en el gel se realizó a un voltaje constante de 50 V. La segunda fase de separación de las proteínas se realizó a un voltaje constante de 150 V. La electroforesis se realizó en un tampón de ánodo Tris-HCl 0,2 M pH 8,9 y un tampón de cátodo Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M y SDS 0,1% (p/v).

La transferencia de las proteínas se realizó a una membrana de PVDF (BioTrace PVDF, Pall Corporation) durante 1 hora a 100 V constantes a 4°C en un tampón de transferencia Tris 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol 20% (v/v). Tras la transferencia, las membranas se tiñeron con solución de rojo Ponceau [Ponceau S 0,1% (p/v), ácido acético 5% (v/v)] hasta visualizar las carreras de proteínas para comprobar la eficacia de la transferencia. Posteriormente las membranas se lavaron con agua destilada y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación en solución de bloqueo IV. A continuación se incubaron con los anticuerpos primarios específicos diluidos en la adecuada solución de bloqueo (ver **Tablas 3 y 4**) durante toda la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente, tras 3 lavados de 10 minutos con TBS-T [Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v)], las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Tras 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia con el reactivo *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare). La imagen se obtuvo mediante revelado de película fotográfica o mediante el lector LAS-3000 (FUJIFILM). La densidad de las bandas se cuantificó usando el software Multi Gauge v2.1 (FUJIFILM).

6. Medidas del ciclo celular.

6.1. Curva de crecimiento celular.

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 25.000 células/pocillo. Cada 24 horas durante 13 días las células se

levantaron con tripsina y se contaron. De esta forma se completó la curva de crecimiento *in vitro*.

6.2. Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo.

Se sembraron 200.000 células/cm² en placas de 10 cm de diámetro. Tras 72 horas en cultivo, las células se levantaron con tripsina, se contaron y se prepararon alícuotas de 10⁶ células. Estas alícuotas se centrifugaron a 250 g durante 10 minutos a 4°C. A continuación se fijaron con etanol 70% frío durante al menos 2 horas a -20°C. Posteriormente las células se centrifugaron a 2700 g durante 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X con 0,05 mg/mL de ioduro de propidio (IP) y 0,25 mg/mL de RNasa. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C, para permitir que el agente fluorescente IP se intercalara en el ADN celular.

Los perfiles del ciclo celular de 30.000 células/clon se analizaron en un citómetro de flujo Facs Canto (BD Biosciences) con un detector FL2. Para el análisis de las fases del ciclo celular se utilizó el *software* Facs Diva (BD Biosciences).

Cada muestra se analizó por duplicado y los experimentos se repitieron al menos 3 veces.

6.3. Evaluación de la viabilidad celular.

El ensayo de viabilidad celular se realizó con el reactivo *alamarBlue* (Bio-Rad), que permite cuantificar la proliferación de líneas celulares. El compuesto *alamarBlue* incorpora un indicador fluorométrico/colorimétrico basado en la detección de actividad metabólica. Este indicador redox cambia de estado oxidado (no fluorescente/color azul) a estado reducido (fluorescente/rojo) ante una reducción del medio de cultivo como consecuencia del crecimiento celular.

Se sembraron 13.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Al día siguiente se eliminó el medio de cultivo y se añadió *alamarBlue* 25% (v/v) en PBS. A tiempos de 6, 10, 24 y 32 horas desde la adición de *alamarBlue* se midió la emisión de fluorescencia a 590 nm de cada pocillo en un lector LAS-3000 (FUJIFILM). La intensidad de fluorescencia se cuantificó usando el software Multi Gauge v2.1 (FUJIFILM).

Cada medida de viabilidad celular se realizó por duplicado y el experimento se repitió 3 veces.

6.4. Ensayo de detección de actividad β -galactosidasa asociada a senescencia.

El ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia detecta la actividad de dicha enzima a pH 6,0, para diferenciarla de la enzima β -galactosidasa lisosomal, activa a pH 4,5. Sin embargo, decidimos eliminar la posibilidad de detectar la actividad de esta última, inhibiéndola con bafilomicina A1. Para detectar la actividad de la enzima utilizamos como sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal), que origina como producto de la reacción un precipitado azul detectable en las células.

Se sembraron 5.000 células/cm² en placas de 6 pocillos. A las 24 horas, las células fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con bafilomicina A1 100 nM para inhibir a la β -galactosidasa lisosomal. Tras lavar las células con PBS 1X, fueron fijadas con glutaraldehído 0,2% (v/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS 1X, las células fueron incubadas durante 6 horas a 37°C y en oscuridad con solución de tinción (C₆N₆FeK₄ 5 mM, C₆N₆FeK₃ 5 mM, MgCl₂ 2 mM, X-gal 1 mg/mL, pH 6,0). Las células azules, positivas para la β -galactosidasa asociada a senescencia, se visualizaron y se contaron en un microscopio de contraste de fases.

Los experimentos se repitieron al menos 3 veces.

7. Parámetros bioquímicos.

7.1. Medidas de actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

La actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial fue evaluada en extractos mitocondriales frescos obtenidos según el apartado 5.4 de material y métodos. Se comprobó la actividad de los complejos I, II, III, IV, I+II y II+III mediante espectrofotometría en un espectrofotómetro BioMate 3 (Thermo Scientific). El flujo de electrones a través de los complejos de la cadena de transporte mitocondrial se puede evaluar mediante la reducción de diversos compuestos, como el aceptor

artificial de electrones 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). Este compuesto es azul en su forma oxidada y es capaz de aceptar electrones de la oxidación del NADH desde el complejo I o FADH₂ desde el complejo II. El DCPIP se vuelve incoloro al reducirse, de forma que los cambios en el estado redox de la solución pueden medirse por espectrofotometría. La actividad de los complejos III y IV se determinó por cambios en la absorbancia al reducirse u oxidarse el citocromo *c*.

Todos los ensayos se realizaron a 37°C en agitación. Los extractos mitocondriales (10-60 ug de proteínas) se incubaron en tampón fosfato sódico 40 mM pH 7,4 durante 1 minuto.

Complejo I: La reacción se inició con DCPIP 75 µM. Después de 1 minuto se añadió NADH 200 µM. La reducción del DCPIP se determinó a 600 nm con un coeficiente de extinción de 19,1 mM⁻¹ cm⁻¹.

Complejo II: La reacción se inició con la adición de cianuro potásico 250 µM y DCPIP 75 µM. Después de 1 minuto se añadió Succinato Sódico 40 mM. La reducción del DCPIP se determinó a 600 nm con un coeficiente de extinción de 19,1 mM⁻¹ cm⁻¹.

Complejo III: La reacción se inició con cianuro potásico 250 µM y citocromo *c* 100 µM. Después de 1 minuto se añadió decilubiquinona 50 µM. La reducción del citocromo *c* se determinó a 550 nm con un coeficiente de extinción de 19,5 mM⁻¹ cm⁻¹.

Complejo IV: La reacción se inició con citocromo *c* 100 µM reducido con ascorbato 500 µM. Se monitorizó la absorbancia a 550 nm. La actividad específica se determinó con un coeficiente de extinción de 19,5 mM⁻¹ cm⁻¹.

Complejo I+III: La reacción se inició con cianuro potásico 250 µM y citocromo *c* 100 µM. Después de 1 minuto se añadió NADH 100 µM. La reducción del citocromo *c* se determinó a 550 nm con un coeficiente de extinción de 19,5 mM⁻¹ cm⁻¹.

Complejo II+III: La reacción se inició con cianuro potásico 250 µM y citocromo *c* 100 µM. Después de 1 minuto se añadió succinato sódico 40 mM. La reducción del citocromo *c* se determinó a 550 nm con un coeficiente de extinción de 19,5 mM⁻¹ cm⁻¹.

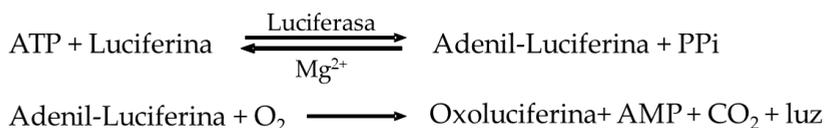
La actividad específica de cada complejo se determinó calculando la diferencia entre la pendiente del tramo inicial y la pendiente tras iniciarse la reacción, y aplicándola a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad del complejo (nmol minuto}^{-1} \text{ mg}^{-1}) = \frac{\left(\frac{\left(\frac{\text{Pendiente} \times 1000}{\epsilon} \right)}{\text{volumen de la muestra}} \right)}{\text{Concentración de proteína}}$$

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los experimentos se repitieron al menos 3 veces.

7.2. Medidas de producción de ATP.

Las células se levantaron con tripsina y se recogieron en el medio de cultivo completo. Se centrifugaron a 100 g durante 5 minutos y el *pellet* celular se resuspendió en PBS 1X (10^6 células/mL). Los niveles de ATP celulares se determinaron usando el kit *Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit* (Sigma-Aldrich), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Mediante este kit podemos cuantificar la cantidad de ATP en la muestra relacionando directamente dicha cantidad con la luz emitida en la siguiente reacción:



Cada muestra fue medida por triplicado en placas multipocillo oscuras en un luminómetro Wallac Victor²™ 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer). Los experimentos se repitieron al menos 6 veces.

7.3. Medidas de consumo de oxígeno.

Las medidas de consumo de oxígeno se realizaron en un electrodo de Clark (Rank Brothers) a 37°C con un agitador magnético. El electrodo de oxígeno de Clark consiste en un cátodo de Pt y un ánodo de Ag inmersos en una solución de KCl y separados de la muestra por una membrana de teflón permeable únicamente al oxígeno. Cuanto más oxígeno hay en la muestra, éste atraviesa la membrana y se genera más corriente entre los electrodos de Pt y Ag. Por tanto, la corriente generada es proporcional a la cantidad de oxígeno de la muestra.

Las células fueron resuspendidas en 1 mL de solución salina de Hank (Invitrogen). El consumo de oxígeno se calculó en nmoles O_2 $min^{-1}/10^6$ células.

Cada medida de consumo de O_2 por clon se repitió al menos 5 veces.

7.4. Medidas del potencial de membrana mitocondrial.

Las medidas del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se realizaron por citometría de flujo marcando las células con la sonda *JC-1* (Molecular Probes, Invitrogen). La sonda *JC-1* permite evaluar el $\Delta\psi_m$ debido a sus propiedades fluorescentes: los monómeros de *JC-1* en el citosol emiten fluorescencia verde, mientras que en la mitocondria *JC-1* forma agregados que emiten fluorescencia roja. De esta manera, los cambios en la emisión de fluorescencia nos indican el estado del $\Delta\psi_m$, de forma que un incremento en la fluorescencia verde sería indicativo de una inactividad mitocondrial, mientras que un incremento en la fluorescencia roja indicaría un elevado $\Delta\psi_m$ y capacidad funcional de las mitocondrias.

Las células fueron resuspendidas en PBS 1X (800.000 células/mL) e incubadas durante 30 minutos a 37°C con 5 $\mu g/mL$ de *JC-1*. En paralelo y como control de desacoplamiento, las células fueron tratadas además con el desacoplador de membrana carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP, Sigma-Aldrich) 500 μM durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente se determinó el $\Delta\psi_m$ por citometría de flujo en un citómetro Facs Canto (BD Biosciences) con un detector FL2. La detección de los monómeros y los agregados de *JC-1* se realizó con los filtros de emisión 530 ± 15 nm y 585 ± 20 nm respectivamente. Los datos se analizaron utilizando el *software* Facs Diva (BD Biosciences).

Cada muestra se analizó por duplicado y los experimentos se repitieron al menos 8 veces.

8. Medidas de la morfología mitocondrial.

Para evaluar la morfología mitocondrial realizamos una inmunofluorescencia indirecta frente a la proteína mitocondrial citocromo *c*. Las células fueron sembradas, fijadas y permeabilizadas como se ha descrito previamente en el apartado 5.1 de material y métodos.

Todas las imágenes se tomaron con un tiempo constante de exposición y ganancia. Se seleccionaron 4 tipos de morfología mitocondrial: predominantemente fragmentada con presencia de mitocondrias pequeñas y redondeadas (fragmentada), predominantemente vesicular, aunque con algunas estructuras tubulares (vesicular), predominantemente con largas mitocondrias formando túbulos (tubular) y mezcla de tubular y vesicular (mixta) (**Figura 11**). Las células se clasificaron en función del patrón mitocondrial que presentaban por parte de un investigador a ciegas, es decir, sin saber a qué tipo de célula correspondía cada imagen. Se contaron al menos 100 células/clon.

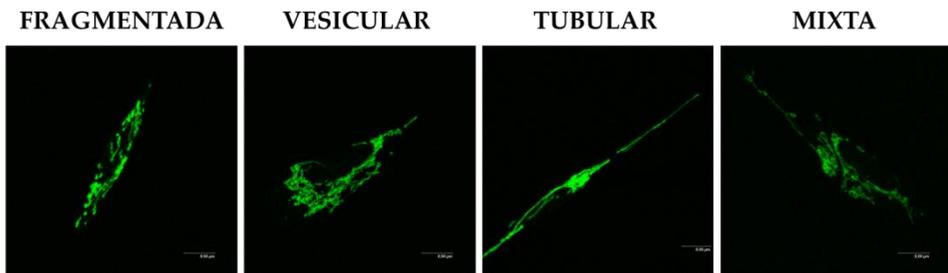


Figura 11. Morfología mitocondrial. Ejemplos de los 4 tipos de red mitocondrial que podemos observar en las células SH-SY5Y: red mitocondrial fragmentada, vesicular, tubular y mixta.

El análisis del número y longitud de las mitocondrias se realizó a partir de imágenes de microscopía confocal de 14-31 células/clon o línea celular usando el programa Image J que permite la identificación automatizada de objetos con umbrales definidos por el usuario para la intensidad y tamaño del píxel. Los objetos definidos como mitocondrias son eskeletonizados para obtener las medidas de número y longitud mitocondriales.

9. Análisis del estrés oxidativo.

9.1. Niveles de expresión de enzimas antioxidantes.

Los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes CuZn superóxido dismutasa (SOD1), Mn superóxido dismutasa (SOD2) y

catalasa se analizaron por *Western Blot* a partir de extractos proteicos totales obtenidos como está descrito en el apartado 5.2 de material y métodos.

La cuantificación de los niveles de enzimas antioxidantes se realizó a partir de al menos 3 extractos proteicos totales diferentes.

9.2. Detección de proteínas carboniladas.

Los niveles de proteínas carboniladas se detectaron usando el kit *Oxyblot™ Protein Oxidation Detection Kit* (Millipore). Los lisados celulares obtenidos como describimos en el apartado 5.2 de material y métodos se dividieron en alícuotas de 15 µg de proteínas y se incubaron con SDS 12% en una solución con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El DNPH interacciona con los grupos carbonilo de las proteínas, originando proteínas derivatizadas con grupos 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP). Las muestras derivatizadas se resolvieron en un gel desnaturalizante al 12% de poliacrilamida y las proteínas con grupos DNP fueron inmunodetectadas con un anticuerpo que reconocía grupos DNP.

La cuantificación de los niveles de carbonilación de proteínas se realizó a partir de al menos 3 extractos proteicos totales diferentes.

9.3. Detección celular del anión superóxido.

La detección del anión superóxido en células se realizó usando la sonda *MitoSOX™ Red superoxide indicator* (Molecular Probes, Invitrogen). La sonda *MitoSOX™* se dirige específicamente a la mitocondria, donde es oxidada únicamente por la presencia de anión superóxido, emitiendo fluorescencia roja. Las células se sembraron sobre cubres de vidrio de 13 mm de diámetro en placas de 6 pocillos a una densidad de 20.000 células/cm². Al día siguiente se incubaron con *MitoSOX™* 3,75 µM en PBS 1X durante 10 minutos a 37°C y en oscuridad. Posteriormente las células se fijaron como está descrito en el apartado 5.1 de material y métodos y se marcaron con DAPI. Como control positivo se usaron las células SH-SY5Y tratadas con H₂O₂ 50 µM durante toda la noche. Las imágenes de más de 200 células se analizaron con el programa Image J midiendo la cantidad de fluorescencia como los píxeles iluminados y determinando los niveles de fluorescencia relativos al área celular.

10. Análisis de apoptosis.

La detección de muerte celular programada se realizó evaluando la presencia del marcador apoptótico caspasa-3 activada y la salida del citocromo *c* desde la mitocondria al citosol mediante *Western Blot*. Estos marcadores se analizaron en fracciones citosólicas y mitocondriales, obtenidas como se describe en el apartado 5.3 de material y métodos, tras 72 horas y 6 días después de la siembra celular. Como control apoptótico se usaron las células SH-SY5Y irradiadas con luz ultravioleta a temperatura ambiente en dosis de 8 Julios/cm² durante 30 segundos. Las células apoptóticas se recogieron 16 horas después del tratamiento, que es un intervalo de tiempo suficiente para el estudio de la señalización de activación de la apoptosis. El análisis de la apoptosis celular se realizó por triplicado a partir de 3 extracciones proteicas diferentes.

También se evaluaron los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax por *Western Blot*. La proteína Bcl-2 es un marcador de supervivencia celular, mientras que Bax es una proteína pro-apoptótica. Calculando el cociente entre la expresión de Bcl-2 y Bax pudimos estimar la relación de supervivencia celular.

11. Análisis del proceso de autofagia.

11.1. Transfección de las células con el plásmido pEGFP-LC3.

Las células se transfectaron con el plásmido pEGFP-LC3 con lipofectamina (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. 24 horas después de la transfección, las células se fijaron como se ha descrito en el apartado 5.1 de material y métodos, se marcaron con DAPI y se analizaron por microscopía de fluorescencia. Se contó el número de células transfectadas que presentaban vesículas positivas para el marcador LC3B-II.

11.2. Niveles de expresión de marcadores autofágicos.

Los niveles de las proteínas LC3B-II y p62 fueron evaluados en condiciones basales por *Western Blot*. Los niveles de catepsina D se evaluaron por inmunofluorescencia indirecta siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.1 de material y métodos.

Además se testaron los niveles del marcador de autofagia LC3B-II por *Western Blot* en extractos proteicos de células sometidas a distintos tratamientos: bafilomicina A1 (Sigma-Aldrich) 0,1 μM durante 2 horas, insulina (Sigma-Aldrich) 100 nM durante 90 minutos, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich) 1 μM durante 2 horas y crecimiento de las células en medio DMEM-F12 sin FBS durante toda la noche. Los extractos proteicos se obtuvieron como está descrito en el apartado 5.2 de material y métodos.

12. Análisis del estrés de retículo endoplasmático.

La susceptibilidad al estrés de retículo endoplasmático (RE) se midió siguiendo el protocolo de Vernia (Vernia *et al.*, 2009). Las células SH-SY5Y se trataron con taspigarguina 1 μM (Alomone Labs) durante 18 horas en cultivo. Los niveles de proteína BIP se analizaron por *Western Blot* a partir de extractos proteicos totales extraídos como describimos en el apartado 5.2 de material y métodos.

Para analizar la apoptosis por citometría de flujo, las células previamente tratadas con taspigarguina se sometieron al mismo protocolo descrito en el apartado 6.2 de material y métodos.

El análisis de apoptosis por *Western Blot* se realizó midiendo los niveles de proteína caspasa-3 activada sobre extractos proteicos totales extraídos como describimos en el apartado 5.2 de material y métodos.

13. Medidas de calcio.

13.1. Estudio de la homeostasis del calcio.

Para estudiar las variaciones en los niveles de calcio citosólico en las células utilizamos la sonda *Fura-2 AM* (Molecular Probes, Invitrogen). Esta sonda se queda en el citosol celular y es capaz de unir calcio reversiblemente. La sonda emite fluorescencia al ser excitada a distintas longitudes de onda (λ) dependiendo de si está libre o unida a calcio. De esta forma podemos establecer los niveles citosólicos de Ca^{2+} como el cociente de la fluorescencia emitida a 510 nm al excitar alternativamente a 340 nm (λ de excitación de la sonda unida a Ca^{2+}) y a 380 nm (λ de excitación de la sonda libre).

Para marcar las células con la sonda *Fura-2 AM*, se sembraron 20.000 células/cm² en cubres de vidrio de 25 mm de diámetro. Tras 24 horas, las células se incubaron con tampón HCSS (NaCl 120 mM, MgCl₂ 0,8 mM, HEPES 25 mM y KCl 5,4 mM, pH 7) suplementado con Glucosa 30 mM, *Fura-2 AM* 5 μM y ácido plurónico 0,06% (p/v) durante 30 minutos a 37°C. Tras la incubación, las células se lavaron con tampón HCSS con CaCl₂ 2 mM durante 30 minutos a 37°C.

Siguiendo el protocolo de Pla-Martín (Pla-Martín *et al.*, 2013) evaluamos la capacidad de las células para mantener la homeostasis de calcio ante diferentes estímulos que alteran los niveles intracelulares de Ca²⁺. La veratridina es un activador de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje en la membrana plasmática, lo que causa la apertura de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje, aumentando el contenido intracelular de Ca²⁺. El 2,5-di-(ter-butil)-1,4-benzohidroquinona (tBuBHQ) inhibe la bomba SERCA causando el vaciado de Ca²⁺ del RE.

Una vez las células se cargaron con la sonda *Fura-2 AM* y con calcio, se observaron los cambios en el flujo intracelular de calcio tras la adición de veratridina 25 μM (Sigma-Aldrich) en medio HCSS con CaCl₂ 2 mM, o con tBuBHQ 100 μM (Alomone Labs) en medio HCSS sin calcio. Para activar el mecanismo del SOCE, de entrada de calcio activada por la liberación de calcio del RE con tBuBHQ, se añadió CaCl₂ 2 mM.

Los experimentos se repitieron al menos 3 veces midiendo el efecto en al menos 100 células. Las imágenes se analizaron con el *software* Leica MM Fluor.

13.2. Captación mitocondrial de calcio.

Para estudiar la captación de calcio por parte de la mitocondria adaptamos el protocolo de Traba (Traba *et al.*, 2012). Las células se sembraron en 1 placa de 15 cm de diámetro. Cuando alcanzaron una confluencia del 70-80%, se levantaron con tripsina y se recogieron en el medio de cultivo completo. Las células se centrifugaron a 100 g durante 5 minutos y el *pellet* celular se resuspendió en tampón IC [10⁶ células/mL de tampón IC (KCl 125 mM, KH₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 20 mM pH 7,4)]. Se añadió digitonina 100 μM para permeabilizar las células, de forma que se rompe la membrana plasmática pero no las mitocondrias. Esta solución se incubó con la sonda *Calcium Green 5N* 0,1 μM (Molecular Probes, Invitrogen), que se une al calcio presente en la solución, succinato 5 mM como fuente de electrones para el complejo II, rotenona 1

μM para inhibir el complejo I y ADP 100 μM para la fijación de ATP, necesaria para la captación mitocondrial de calcio.

Los experimentos se realizaron en un luminómetro Wallac Victor²™ 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer) a 30°C. La captación mitocondrial de calcio se evaluó monitorizando el descenso en la fluorescencia a 535 nm cada 7 minutos tras la adición de pulsos de CaCl_2 4 mM, hasta que los valores de fluorescencia se recuperaran o no volvieran a bajar, lo que indicaba la apertura irreversible del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, PTP.

Los experimentos se repitieron al menos 4 veces. Las medidas se repitieron en presencia de Rojo Rutenio 200 nM (Sigma-Aldrich), que bloquea el uniportador mitocondrial de calcio, MCU, para descartar el efecto del RE en la captación de calcio y por tanto en la disminución de fluorescencia.

14. Microscopía electrónica.

Las imágenes de microscopía electrónica se realizaron en el Servicio de Microscopía del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia). Las células sembradas en cámaras *chamberslide 2 wells* de permanox (Nunc) se fijaron sucesivamente con glutaraldehído 2,5% (v/v) en PB 0,1 M pH 7,4 durante 5 minutos a 37°C y durante 1 hora a 4°C. Tras 4 lavados de 5 minutos cada uno con PB 0,1 M, las células fueron postfijadas con OsO_4 2% durante 1 hora a temperatura ambiente y se tiñeron con acetato de uranilo 2% durante 2 horas a 4°C en oscuridad. Posteriormente se lavaron con agua destilada, se deshidrataron en etanol y se infiltraron en resina Durcupan (Sigma-Aldrich) toda la noche. Tras la polimerización, las células embebidas en la resina se separaron de las cámaras de cultivo y se pegaron a bloques de araldita. Se cortaron en secciones semifinas (1,5 μm) con un Ultracut UC-6 (Leica) y se montaron en portaobjetos donde se tiñeron con azul de toluidina 1%. Las secciones semifinas seleccionadas se pegaron a bloques de araldita y se separaron del portaobjetos con ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación. Las secciones ultrafinas (0,06-0,08 μm) se prepararon con el Ultracut y se tiñeron con citrato de plomo. Finalmente se obtuvieron las imágenes en un microscopio de transmisión electrónica FEI Tecnai G2

Spirit (FEI Europe) usando una cámara digital Morada (Olympus Soft Image Solutions GmbH).

15. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó el test ANOVA para el análisis de la varianza entre las diferentes poblaciones celulares. Las comparaciones múltiples *a posteriori* se realizaron aplicando el test de Tukey. Los valores mostrados representan la media \pm error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos independientes. Para la significatividad de cada caso se consideraron los siguientes p-valores: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) y $p \leq 0,001$ (***)

RESULTADOS

"El éxito es ir de fallo en fallo sin perder el entusiasmo."

Winston Churchill.

1. Silenciamiento estable de la expresión de *FXN* y de *GDAP1*.

Para estudiar el papel de frataxina y de *GDAP1* en el proceso neurodegenerativo, previamente se generaron en el laboratorio varias líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y con expresión estable de pequeñas horquillas de ARN dirigidas contra los respectivos ARN mensajeros de estas dos proteínas. Así, las células SH-SY5Y se transfectaron con plásmidos que codificaban para un ARN de interferencia (ARNi) frente al gen *FXN* o *GDAP1*. Como control negativo, las células SH-SY5Y se transfectaron con el plásmido pLKO.1-NT, capaz de activar el mecanismo de silenciamiento génico por ARNi, pero sin ningún gen humano como diana. Las células transfectadas se mantuvieron en medio de cultivo suplementado con puromicina para permitir su selección. Se amplificaron varios clones para el silenciamiento de cada gen, comprobándose la disminución en los niveles del ARN mensajero y de la proteína correspondiente. Finalmente se seleccionaron dos clones SH-SY5Y con silenciamiento estable para ambos genes. Los clones *FXN*-138.1 y *FXN*-138.2 presentaban una disminución en los niveles de proteína frataxina del 82% y del 78% respectivamente con respecto a los valores del control pLKO.1-NT (**Figura 12A**). Los clones *GDAP1*-G1 y *GDAP1*-G4 presentaban una disminución en los niveles de proteína *GDAP1* del 37% y del 58% respectivamente con respecto a los valores del control pLKO.1-NT (**Figura 12B**). Posteriores análisis mediante *Western Blot* de los niveles de proteínas confirmaron que el silenciamiento se mantenía constante a lo largo del tiempo en cultivos celulares mantenidos de 1 a 6 meses.

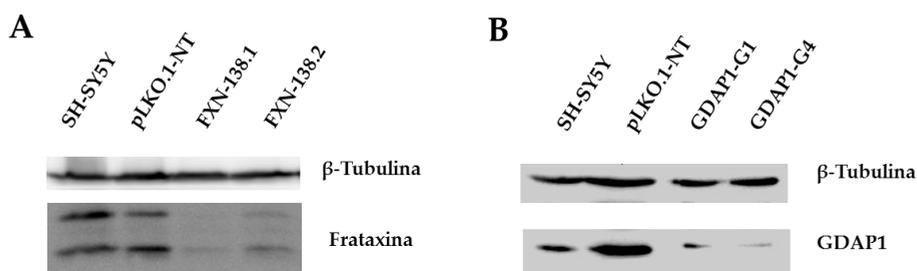


Figura 12. Disminución de los niveles de las proteínas frataxina y *GDAP1* por ARNi. Las células SH-SY5Y se transfectaron con los vectores pLKO.1-FXN y pLKO.1-GDAP1. Se seleccionaron dos clones SH-SY5Y con silenciamiento más eficaz para los genes *FXN* y *GDAP1* respectivamente. Como controles se emplearon la línea SH-SY5Y sin transfectar y la línea SH-SY5Y transfectada con el

vector no dirigido pLKO.1-NT. **A)** Detección de los niveles de proteína frataxina mediante *Western Blot* en las células control SH-SY5Y y pLKO.1-NT, y en los clones FXN-138.1 y FXN-138.2, mediante un anticuerpo anti-frataxina que reconoce la forma intermedia de 19 kDa y la forma madura de 14 kDa de la proteína frataxina. Los clones FXN-138.1 y FXN-138.2 mostraban una reducción en los niveles de frataxina del 82% y del 78% respectivamente respecto a los niveles del control pLKO.1-NT. **B)** Detección de los niveles de proteína GDAP1 mediante *Western Blot* en las células control SH-SY5Y y pLKO.1-NT, y en los clones GDAP1-G1 y GDAP1-G4, mediante un anticuerpo anti-GDAP1 que reconoce la proteína GDAP1 de 41 kDa. Los clones GDAP1-G1 y GDAP1-G4 mostraban una reducción en los niveles de GDAP1 del 37% y del 58% respectivamente respecto a los niveles del control pLKO.1-NT.

2. Las células deficientes en frataxina presentan un crecimiento celular enlentecido por alteración del ciclo celular.

Para evaluar si el déficit de frataxina o de GDAP1 afectaba a la proliferación celular, realizamos una curva de crecimiento mediante el conteo de las células en cultivo celular durante 13 días consecutivos, partiendo del mismo número de células para cada uno de los clones. La curva de crecimiento reveló un menor número de células deficientes en frataxina al final del conteo con respecto al número de células control y de células deficientes en GDAP1. Estos resultados sugerían que el déficit de frataxina en los clones FXN-138.1 y FXN-138.2 causaba una proliferación celular enlentecida a lo largo del tiempo con respecto a los controles SH-SY5Y y pLKO.1-NT. Sin embargo, los clones deficientes en GDAP1 GDAP1-G1 y GDAP1-G4 mostraban una tasa de proliferación similar a la de los controles, aunque con ligeras diferencias entre ambos clones (**Figura 13**).

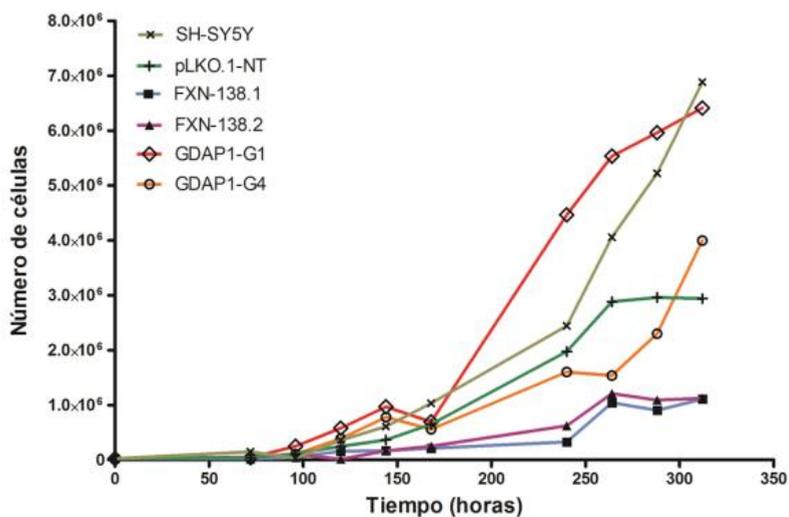


Figura 13. Curvas de crecimiento celular de los diferentes clones. El conteo de células durante 13 días consecutivos mostraba un crecimiento enlentecido de los clones deficientes en frataxina, FXN-138.1 (azul) y FXN-138.2 (morado), con respecto a los controles SH-SY5Y (marrón) y pLKO.1-NT (verde). Los clones deficientes en GDAP1, GDAP1-G1 (rojo) y GDAP1-G4 (naranja), aunque presentaban ligeras diferencias de crecimiento entre ellos, poseían una tasa de proliferación similar a la de los controles.

El análisis por citometría de flujo de la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular confirmó que la disminución en el número de células deficientes en frataxina se debía a un retraso en el crecimiento de estas células por alteraciones en el ciclo celular. En concreto, el déficit de frataxina causaba una reducción del número de células en fase S, una reducción en el número de células con progresión de la fase G2 a mitosis y un aumento en el número de células detenidas en la fase G1, con respecto al control pLKO.1-NT (**Figura 14**). Estas diferencias eran significativas para el clon con mayor reducción de la proteína frataxina, el clon FXN-138.1 y para el clon FXN-138.2 en la fase G2/M. Las células deficientes en GDAP1 no mostraron alteraciones en la distribución del ciclo celular, como era de esperar dado que su crecimiento celular era similar al de las células control.

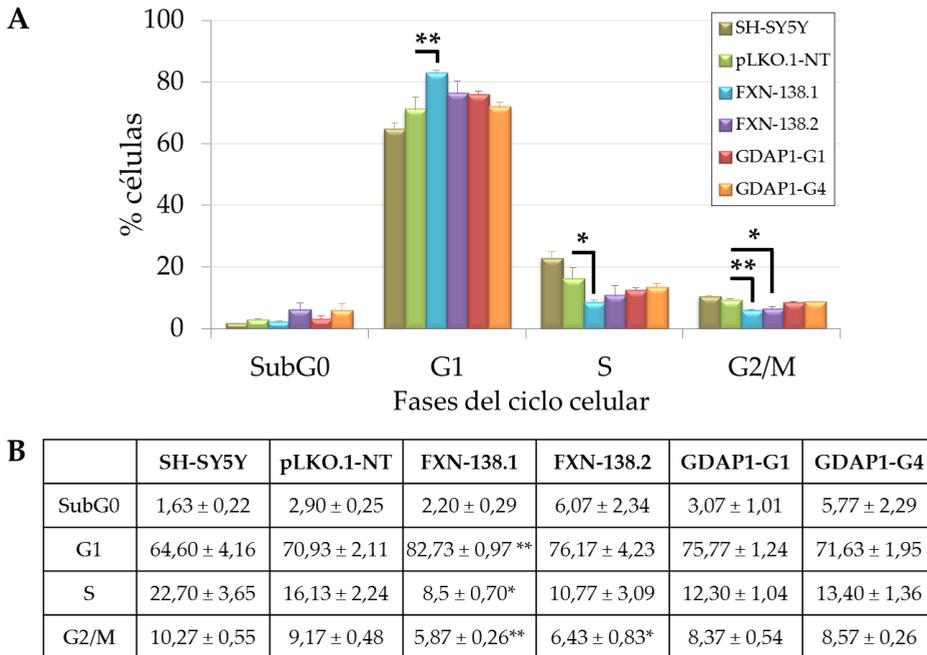


Figura 14. Distribución del ciclo celular de los diferentes clones. A) Representación gráfica de la proporción media y su desviación de células en las distintas fases del ciclo celular para cada uno de los clones. **B)** Valores promedio ± SEM del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular. Significatividad * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al control pLKO.1-NT.

3. La disminución de frataxina o de GDAP1 no causa muerte celular.

Puesto que los clones deficientes en frataxina mostraban un crecimiento celular enlentecido, nos preguntamos si el déficit de esta proteína afectaba la viabilidad de las células. Para responder a esto realizamos un ensayo de viabilidad celular en presencia del reactivo *alamarBlue*. Como se ha explicado en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos, este reactivo incorpora un indicador que emite fluorescencia cuando se reduce como consecuencia del metabolismo celular. De esta forma, pudimos cuantificar la actividad celular por cambios en la fluorescencia del medio de cultivo. Los valores de fluorescencia a diferentes tiempos de cultivo (6, 10, 24 y 32 horas desde la adición de *alamarBlue* al medio de cultivo) no variaban entre los distintos clones, por lo que tenían similares valores de viabilidad celular, como se muestra en la **Figura 15**. Estos datos nos indicaban que la reducción en la

proliferación celular de las células deficientes en frataxina no se debía a una disminución en su viabilidad.

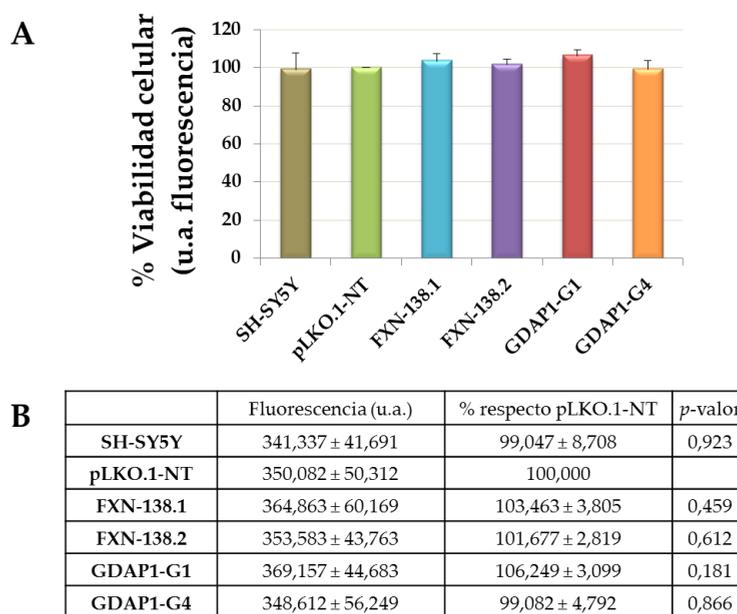


Figura 15. El déficit de frataxina o de GDAP1 no afecta la viabilidad celular. La cantidad de fluorescencia del medio de cultivo está directamente relacionada con la cantidad de células metabólicamente activas presentes. **A)** La viabilidad celular, representada en % con respecto al control pLKO.1-NT, no variaba entre los diferentes clones, por lo que el déficit de frataxina o de GDAP1 no afectaba a la viabilidad de las células SH-SY5Y. **B)** Valores de fluorescencia del medio de cultivo en los diferentes clones y sus respectivos porcentajes con respecto a los valores del control pLKO.1-NT. Los valores representados corresponden a 24 horas de cultivo celular, siendo similares a 6, 10 y 32 horas de cultivo celular.

Para confirmar que la reducción en el número de células deficientes en frataxina no se debía a un aumento en el proceso de muerte celular programada, decidimos evaluar la presencia en las células de marcadores de apoptosis. La caspasa-3 activada y la salida del citocromo *c* desde la mitocondria al citosol son marcadores inequívocos de la activación irreversible de apoptosis (Srinivasan *et al.*, 1998; Dinsdale *et al.*, 1999). Como control positivo de apoptosis sometimos a las células SH-SY5Y a un pulso de luz ultravioleta, induciendo su entrada en apoptosis. Mediante *Western Blot* analizamos la presencia de citocromo *c* en extractos citosólicos y mitocondriales de cada uno de los clones, así como

la presencia en los extractos citosólicos de la proteína caspasa-3 activada, por detección de las dos bandas generadas tras su activación.

Ninguno de los clones presentaba activación de la caspasa-3 ni citocromo *c* en el citosol en condiciones basales después de 72 horas o 6 días de cultivo celular, como se muestra en las **Figuras 16A** y **16B**. Únicamente detectamos citocromo *c* y caspasa-3 activada en el citosol de células SH-SY5Y tratadas con luz ultravioleta.

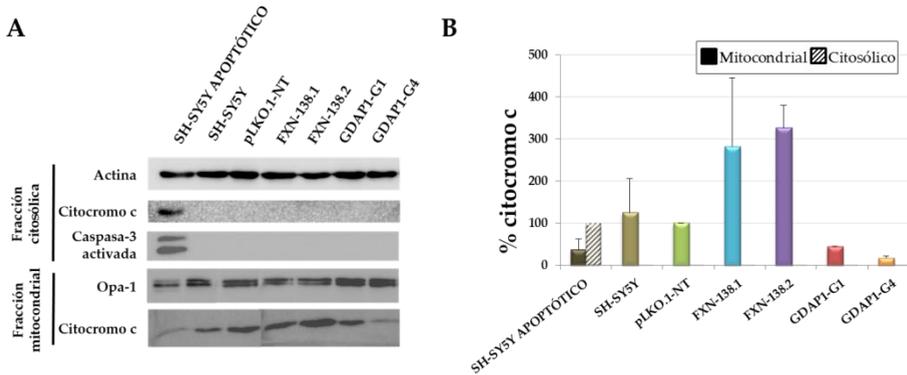


Figura 16. El déficit de frataxina o de GDAP1 no aumenta la apoptosis en condiciones basales. **A)** Mediante *Western Blot* se analizó la localización subcelular del citocromo *c* en extractos citosólicos y mitocondriales y el procesamiento de la proteína pro-apoptótica caspasa-3 en el citosol de los diferentes clones SH-SY5Y. Como control positivo de apoptosis se expuso a las células SH-SY5Y a radiación UV. Ninguno de los clones, salvo el control apoptótico, presentaba signos de apoptosis por activación de caspasa-3 y/o salida del citocromo *c* desde la mitocondria al citosol. Como control de carga se detectó actina en los extractos citosólicos y Opa-1 en los extractos mitocondriales. **B)** Cuantificación de los niveles subcelulares de citocromo *c* expresada como el porcentaje respecto a los niveles del control pLKO.1-NT en el caso de citocromo *c* mitocondrial y el porcentaje respecto a los niveles del control SH-SY5Y apoptótico en el caso del citocromo *c* citosólico.

La familia de proteínas Bcl-2 incluye miembros anti-apoptóticos, como la proteína Bcl-2, y miembros pro-apoptóticos, como la proteína Bax. La relación de la expresión de estas dos proteínas determina la supervivencia o la muerte celular, de forma que el estudio de la expresión Bcl-2/Bax puede servirnos como un indicador del estado de supervivencia celular (Oltvai *et al.*, 1993; Yang & Korsmeyer, 1996). El análisis por *Western Blot* de estas proteínas reveló que en los clones deficientes en GDAP1 el cociente de la expresión Bcl-2/Bax estaba

disminuido aproximadamente la mitad comparado con el control pLKO.1-NT (**Figura 17A**). Esta disminución del cociente Bcl-2/Bax se debía al aumento en los niveles de la proteína Bax y disminución de la proteína Bcl-2 con respecto al control (**Figura 17B**). En el caso del déficit de frataxina, los dos clones se comportaban de distinta forma. El clon FXN-138.2 presentaba un cociente de la expresión Bcl-2/Bax disminuido aproximadamente a la mitad comparado con el control pLKO.1-NT (**Figura 17A**) debido a un incremento en los niveles de proteína Bax sin alteración en los niveles de Bcl-2 con respecto al control (**Figura 17B**). Sin embargo, el clon FXN-138.1 presentaba un incremento del cociente Bcl-2/Bax de aproximadamente 1,5 veces el control pLKO.1-NT (**Figura 17A**) debido a un aumento en la expresión de Bcl-2 sin alteración de los niveles de Bax con respecto al control (**Figura 17B**).

El hecho de que observemos diferencias en la relación Bcl-2/Bax en los clones deficientes en frataxina y en GDAP1 con respecto a las células control en condiciones basales nos da información sobre cómo responderían estas células deficientes ante determinadas situaciones de estrés. Un aumento en los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax no indica necesariamente presencia de muerte celular, ya que Bax se expresa en situaciones basales en una variedad de líneas celulares. Sin embargo, una elevada presencia de Bax aceleraría la apoptosis tras un estímulo de muerte celular, contrarrestando la actividad anti-apoptótica de Bcl-2 (Oltvai *et al.*, 1993). Por tanto, el cociente entre Bcl-2 y Bax determina la susceptibilidad a la muerte celular ante un estímulo apoptótico, de forma que cuando hay un exceso de la proteína Bcl-2 las células se encontrarían protegidas, mientras que cuando hay un exceso de la proteína Bax las células presentarían mayor susceptibilidad a la apoptosis. De esta forma, el aumento en los niveles de Bax en las células deficientes en GDAP1 y en el clon FXN-138.2 no indicaría presencia de apoptosis en estas células, como hemos comprobado previamente (**Figura 16**). Sin embargo, estos resultados nos sugieren que estas células presentarían mayor susceptibilidad a la muerte celular programada ante un estímulo apoptótico.

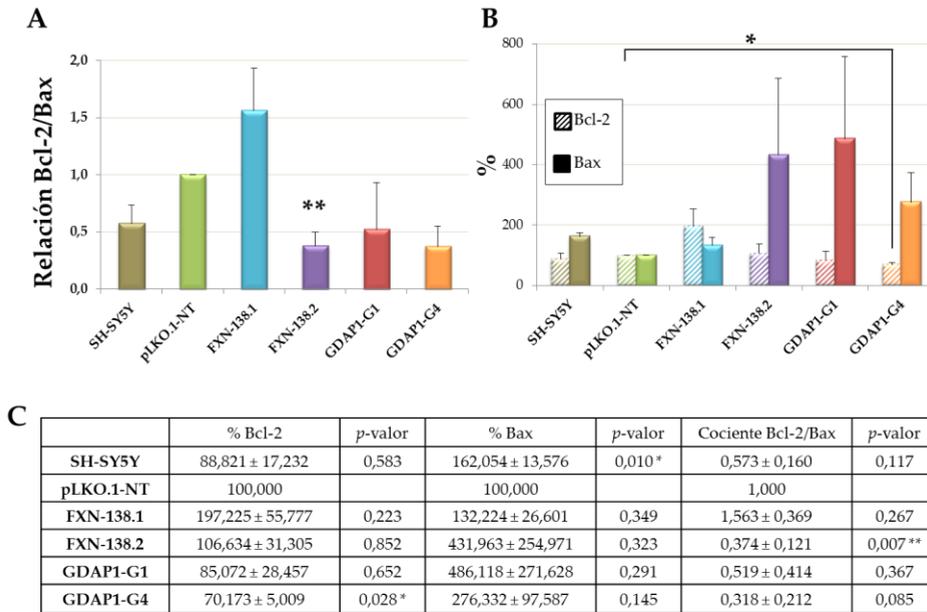


Figura 17. Análisis de los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax. **A)** El cociente Bcl-2/Bax se determinó analizando los niveles de ambas proteínas mediante *Western Blot*. Los valores se representan como incrementos respecto al valor del control pLKO.1-NT = 1,0. **B)** Porcentaje de los niveles de expresión de las proteínas Bax y Bcl-2 de los diferentes clones con respecto a los niveles del control pLKO.1-NT. Los clones deficientes en GDAP1 presentaban una disminución en la supervivencia celular debida a la disminución en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y al aumento de la proteína pro-apoptótica Bax. Los clones deficientes en frataxina se comportaban de distinta manera: el clon FXN-138.1 presentaba un aumento en la supervivencia celular por incremento en los niveles de Bcl-2, mientras que el clon FXN-138.2 presentaba una disminución en la supervivencia celular por aumento en la expresión de Bax. **C)** Porcentajes de los niveles de Bcl-2 y Bax para cada clon con respecto al control pLKO.1-NT, así como el cociente entre los valores de ambas proteínas. Significatividad * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al control pLKO.1-NT.

4. Las células deficientes en frataxina y en GDAP1 entran en senescencia.

Puesto que los clones deficientes en frataxina presentaban un retraso en el crecimiento celular que no se debía a una disminución en la viabilidad celular ni a un aumento en la apoptosis decidimos evaluar la senescencia celular. La senescencia replicativa es un proceso por el cual las células entran en un estado irreversible de detención del ciclo celular.

Diversos factores como el estrés oxidativo, el daño en el ADN, la activación de oncogenes o la falta de nutrientes pueden inducir una entrada prematura en senescencia (Hwang *et al.*, 2009). Las células senescentes presentan como características: detención en la fase G1 del ciclo celular, tienen un metabolismo activo, se vuelven alargadas y adquieren mayor adhesión a la matriz extracelular, presentan un fenotipo secretor (SASP, por *senescence-associated secretory phenotype*) y un aumento en los niveles de expresión de las proteínas p53, p21 y p16. Además presentan un incremento en la actividad β -galactosidasa, lo cual es ampliamente utilizado como marcador de detección de senescencia celular (Dimri *et al.*, 1995). El ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal, por *senescence-associated β -galactosidase*) detecta la actividad de dicha enzima a pH 6,0, para diferenciarla de la enzima β -galactosidasa lisosomal, activa a pH 4,5. Sin embargo, al realizar el ensayo celular decidimos eliminar la posibilidad de detectar la actividad de esta última, inhibiéndola con bafilomicina A1. Las células fijadas se incubaron con solución de tinción que lleva X-gal, que actúa como sustrato de la enzima β -galactosidasa, dando como producto de su actividad un precipitado azul detectable en las células senescentes. El conteo de células azules positivas para la actividad SA- β -gal era significativamente superior en los clones deficientes en frataxina y el clon con mayor silenciamiento de *GDAP1*, el clon GDAP1-G4, con respecto a los controles (**Figura 18**).

El hecho de que el déficit de frataxina indujera una mayor proporción de células con elevada actividad SA- β -gal concordaba con la retención en la fase G1 del ciclo celular mostrada anteriormente (**Figura 14**). Estas características propias de senescencia celular, junto con la observación en estas células de un fenotipo alargado y un crecimiento celular enlentecido sugieren que el déficit de frataxina causa senescencia celular. En el caso del déficit de *GDAP1*, sólo las células con menor cantidad de proteína presentaban mayor actividad SA- β -gal. Sin embargo, en estas células no observamos una retención en la fase G1 del ciclo celular, ni un crecimiento enlentecido con respecto a las células control, ni un fenotipo celular alargado como en las células deficientes en frataxina, todas ellas características de células senescentes. Por esto, no podemos afirmar que el déficit de *GDAP1* induzca senescencia celular. Al igual que para las células deficientes en frataxina, sería necesario evaluar la presencia de otros marcadores de senescencia celular como el aumento en los niveles

de determinadas proteínas asociadas a senescencia celular para poder confirmar que el déficit en frataxina o en *GDAP1* induce la entrada en senescencia celular.

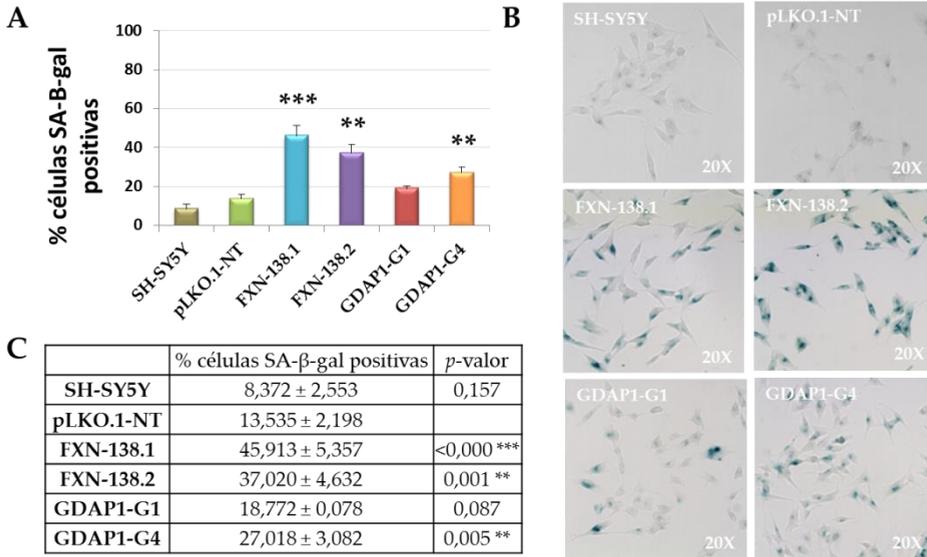


Figura 18. Incremento de la senescencia celular en las células deficientes en frataxina y en *GDAP1*. **A)** Proporción de células positivas para la actividad de la β-galactosidasa asociada a senescencia. Las células deficientes en frataxina y las células con mayor silenciamiento de *GDAP1*, el clon *GDAP1-G4* presentaban un aumento en la actividad SA-β-gal comparado con el control pLKO.1-NT. **B)** Imágenes representativas para cada uno de los clones de la proporción de células azules, positivas para la actividad SA-β-gal. **C)** Porcentaje de células SA-β-gal positivas para cada clon. Significatividad * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ respecto al control pLKO.1-NT.

5. Las alteraciones en el metabolismo energético mitocondrial son diferentes en ambos modelos de neuropatías.

Para evaluar el metabolismo bioenergético de las células con silenciamiento de *FXN* y de *GDAP1* analizamos la actividad de la cadena de transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y el potencial de membrana mitocondrial.

Respecto a la cadena de transporte de electrones mitocondrial, mantuvimos en cultivo las distintas líneas celulares durante 1 mes (cultivos frescos) y medimos las actividades de los complejos de la

cadena de transporte de electrones en extractos mitocondriales. También quisimos observar si había diferencias a lo largo del tiempo en este proceso, por lo que al mismo tiempo, mantuvimos las líneas celulares durante 6 meses en cultivo (cultivos envejecidos) y medimos las actividades de los complejos de la cadena de transporte de electrones en extractos mitocondriales. De esta forma pudimos comparar los resultados entre los cultivos frescos y envejecidos, para poder observar diferencias asociadas al proceso de envejecimiento.

Al medir las actividades de los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial observamos mayoritariamente una menor actividad de los complejos en cultivos envejecidos que en cultivos frescos, pero estas diferencias estaban presentes en todos los clones, incluidos los controles (**Figura 19 y Tabla 5**), por lo que estas diferencias se debían probablemente a un envejecimiento general de las células.

En cuanto a las actividades concretas de cada complejo, mientras que el déficit de GDAP1 no alteraba la actividad de la cadena de transporte de electrones, el déficit de frataxina causaba una pérdida significativa de actividad del complejo IV (**Figura 19 y Tabla 5**).

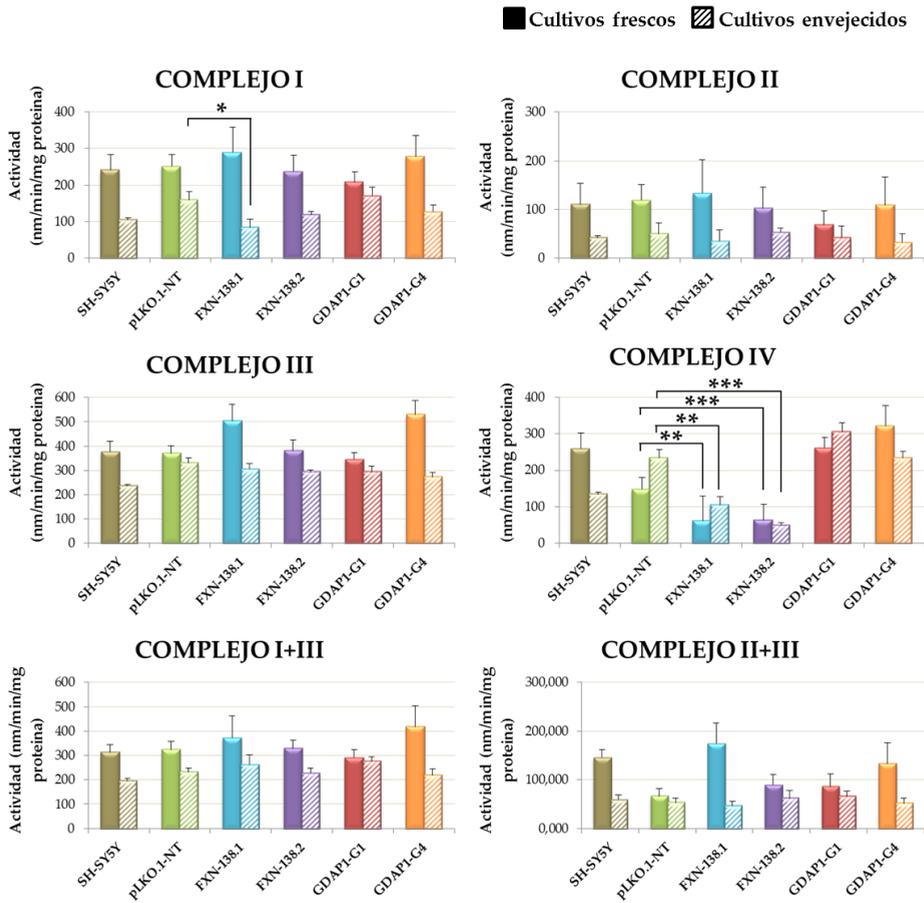


Figura 19. Análisis de la actividad enzimática de la cadena de transporte de electrones. Las células SH-SY5Y, pLKO.1-NT, FXN-138.1, FXN-138.2, GDAP1-G1 y GDAP1-G4 se mantuvieron en cultivo durante 1 mes (cultivos frescos) y 6 meses (cultivos envejecidos). Se determinó la actividad de los complejos I, II, III, IV, I+III y II+III de la cadena de transporte de electrones en extractos mitocondriales. Únicamente observamos diferencias en los clones deficientes en frataxina. El clon FXN-138.1 envejecido poseía menor actividad del complejo I respecto a la actividad del complejo I del control pLKO.1-NT envejecido, y ambos clones deficientes en frataxina poseían menor actividad del complejo IV, tanto en células frescas como envejecidas, con respecto a la actividad del complejo IV en el control pLKO.1-NT fresco y envejecido respectivamente. Significatividad * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ entre los cultivos frescos respecto al control pLKO.1-NT fresco y entre los cultivos envejecidos respecto al control pLKO.1-NT envejecido.

Tabla 6. Actividad enzimática de la cadena de transporte de electrones. Valores promedio \pm SEM de las actividades de los complejos I, II, III, IV, I+III y II+III de la cadena de transporte de electrones en extractos mitocondriales de cultivos frescos y envejecidos de los diferentes clones.

COMPLEJO I	CULTIVOS FRESCOS		CULTIVOS ENVEJECIDOS	
	Actividad (nm/min/mg proteína)	<i>p</i> -valor	Actividad (nm/min/mg proteína)	<i>p</i> -valor
SH-SY5Y	241,400 \pm 42,494	0,857	111,452 \pm 2,184	0,070
pLKO.1-NT	251,402 \pm 32,020		159,951 \pm 22,098	
FXN-138.1	289,752 \pm 68,166	0,628	84,386 \pm 22,692	0,042 *
FXN-138.2	237,340 \pm 43,608	0,799	119,411 \pm 8,021	0,216
GDAP1-G1	207,823 \pm 28,3602	0,347	170,891 \pm 23,316	0,740
GDAP1-G4	278,510 \pm 57,190	0,693	126,899 \pm 18,058	0,261
COMPLEJO II	CULTIVOS FRESCOS		CULTIVOS ENVEJECIDOS	
	Actividad (nm/min/mg proteína)	<i>p</i> -valor	Actividad (nm/min/mg proteína)	<i>p</i> -valor
SH-SY5Y	110,639 \pm 20,479	0,795	41,854 \pm 5,069	0,402
pLKO.1-NT	119,103 \pm 23,475		49,460 \pm 6,903	
FXN-138.1	133,564 \pm 24,760	0,686	35,025 \pm 8,929	0,244
FXN-138.2	102,554 \pm 34,318	0,696	53,108 \pm 19,998	0,832
GDAP1-G1	68,361 \pm 20,608	0,155	42,070 \pm 6,091	0,436
GDAP1-G4	108,881 \pm 34,216	0,814	32,383 \pm 4,726	0,051
COMPLEJO III	CULTIVOS FRESCOS		CULTIVOS ENVEJECIDOS	
	Actividad (nm/min/mg proteína)	<i>p</i> -valor	Actividad (nm/min/mg proteína)	<i>p</i> -valor
SH-SY5Y	377,249 \pm 46,331	0,900	235,895 \pm 38,978	0,177
pLKO.1-NT	369,701 \pm 34,300		330,269 \pm 48,683	
FXN-138.1	504,019 \pm 68,055	0,129	305,969 \pm 38,965	0,718
FXN-138.2	380,147 \pm 90,070	0,908	293,650 \pm 49,911	0,649
GDAP1-G1	344,939 \pm 29,758	0,605	294,507 \pm 38,080	0,572
GDAP1-G4	530,710 \pm 142,342	0,344	237,699 \pm 31,414	0,117
COMPLEJO VI	CULTIVOS FRESCOS		CULTIVOS ENVEJECIDOS	
	Actividad (nm/min/mg proteína)	<i>p</i> -valor	Actividad (nm/min/mg proteína)	<i>p</i> -valor
SH-SY5Y	259,720 \pm 54,270	0,190	157,415 \pm 8,394	0,095
pLKO.1-NT	174,866 \pm 18,590		234,589 \pm 24,334	
FXN-138.1	60,695 \pm 5,277	0,006 **	105,365 \pm 22,649	0,007 **
FXN-138.2	63,122 \pm 7,990	<0,000 ***	48,625 \pm 9,837	<0,000 ***
GDAP1-G1	261,632 \pm 48,675	0,147	306,704 \pm 44,480	0,177
GDAP1-G4	321,406 \pm 63,063	0,067	233,949 \pm 38,260	0,989

COMPLEJO I+III	CULTIVOS FRESCOS		CULTIVOS ENVEJECIDOS	
	Actividad (nm/min/mg proteína)	p-valor	Actividad (nm/min/mg proteína)	p-valor
SH-SY5Y	313,500 ± 30,287	0,810	195,322 ± 11,012	0,079
pLKO.1-NT	324,747 ± 32,853		232,736 ± 14,013	
FXN-138.1	372,882 ± 88,813	0,629	262,433 ± 39,501	0,438
FXN-138.2	329,456 ± 33,373	0,926	228,997 ± 18,762	0,876
GDAP1-G1	291,331 ± 33,170	0,501	276,902 ± 16,798	0,066
GDAP1-G4	418,259 ± 85,446	0,346	218,849 ± 25,470	0,654

COMPLEJO II+III	CULTIVOS FRESCOS		CULTIVOS ENVEJECIDOS	
	Actividad (nm/min/mg proteína)	p-valor	Actividad (nm/min/mg proteína)	p-valor
SH-SY5Y	145,855 ± 16,447	0,013 *	59,336 ± 9,093	0,652
pLKO.1-NT	66,723 ± 15,601		53,453 ± 8,890	
FXN-138.1	174,662 ± 41,900	0,052	46,826 ± 9,204	0,614
FXN-138.2	89,280 ± 21,401	0,421	62,267 ± 16,114	0,612
GDAP1-G1	85,918 ± 26,558	0,556	66,396 ± 10,205	0,354
GDAP1-G4	133,029 ± 43,748	0,203	51,810 ± 10,216	0,908

Dada la disminución de la actividad del complejo IV en los clones deficientes en frataxina, nos preguntamos si este defecto se debía a una reducción de la cantidad del complejo enzimático. Para responder a esto, medimos por *Western Blot* la expresión de la enzima mitocondrial citocromo *c* oxidasa (COX), específicamente las subunidades 1 y 2 (COXI y COXII). Observamos una disminución en la expresión de ambas subunidades del complejo IV en las células deficientes en frataxina, pero no en las células deficientes en GDAP1 ni en los controles (**Figura 20**). Estos resultados confirmaban que la disminución de actividad del complejo IV observada en los clones con silenciamiento de *FXN* se debía a una menor presencia del complejo IV en estas células deficitarias.

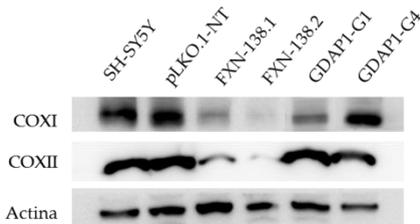


Figura 20. Niveles de expresión de COXI y COXII. El análisis por *Western Blot* del complejo IV en extractos mitocondriales de todos los clones confirmó una menor presencia de las subunidades COXI y COXII en los clones deficientes en frataxina. Estos resultados correlacionaban con la menor actividad del complejo IV en estos clones. Las imágenes de *Western Blot* mostradas son representativas de al menos 3 experimentos con resultados similares.

También medimos la producción de ATP por parte de los diferentes clones. Los resultados fueron diferentes para ambos modelos de neuropatías. Los clones deficientes en GDAP1 presentaban más cantidad de ATP que el control pLKO.1-NT, aunque este incremento no era significativo, mientras que los clones deficientes en frataxina presentaban una reducción significativa en la producción de ATP (**Figura 21A**). El análisis de los niveles de ATP en fibroblastos de pacientes FRDA nos confirmó la disminución en dichos niveles asociada al déficit de frataxina (**Figura 22**).

Observamos además una correlación con el consumo de oxígeno. Los clones deficientes en GDAP1 poseían una mayor tasa de respiración mitocondrial, mientras que en los clones deficientes en frataxina el consumo de oxígeno estaba disminuido con respecto al control pLKO.1-NT (**Figura 21B**).

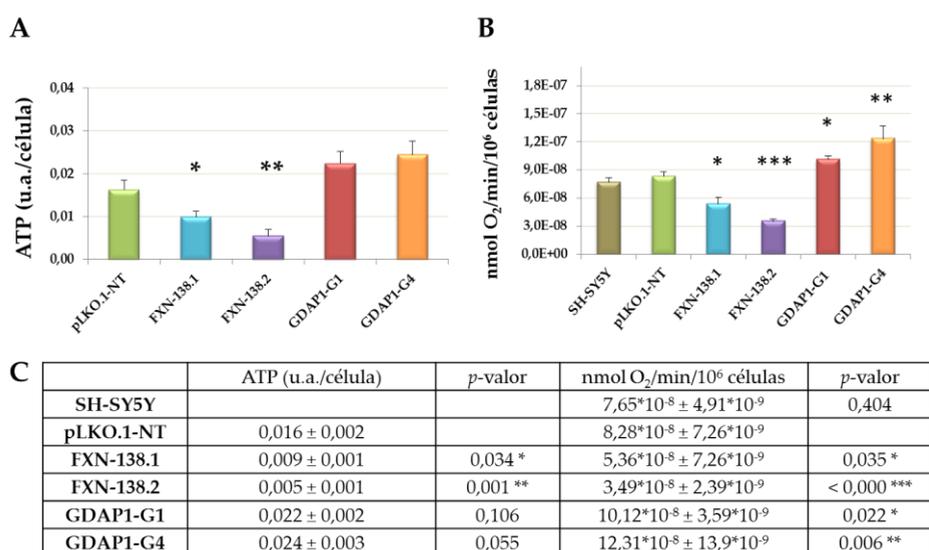


Figura 21. Producción de ATP y consumo de oxígeno. **A)** Los niveles de ATP en los diferentes clones reveló un comportamiento contrario ante el déficit de frataxina y de GDAP1. La producción de ATP estaba disminuida en los clones deficientes en frataxina, mientras que el déficit en GDAP1 causaba una mayor producción de ATP comparados con el control pLKO.1-NT. **B)** El consumo de oxígeno medido en las células revelaba una correlación con la producción de ATP, siendo menor en los clones FXN y mayor en los clones GDAP1 comparados con los valores del control pLKO.1-NT. **C)** Valores promedio ± SEM de la producción de ATP y el consumo de oxígeno en los diferentes clones. Significatividad *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001 respecto al control pLKO.1-NT.

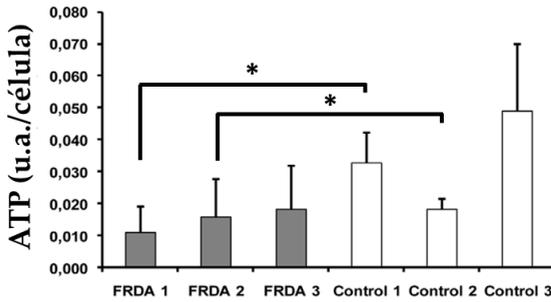


Figura 22. Niveles de ATP en fibroblastos FRDA. El análisis de los niveles de ATP en fibroblastos de pacientes FRDA y en controles sanos reveló una menor producción de ATP asociada al déficit de frataxina. Los datos se representan como los valores promedio \pm SD de más de 3 experimentos independientes.

La producción de ATP era significativamente menor en los fibroblastos FRDA 1 y FRDA 2 que en sus respectivos controles, Control 1 y Control 2 ($p < 0,05$).

6. El déficit de frataxina afecta el potencial de membrana mitocondrial.

El mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) es importante para que la mitocondria desempeñe correctamente sus funciones. Evaluamos el estado del $\Delta\psi_m$ en los diferentes clones, esperando encontrar diferencias entre los dos modelos de neuropatía, dado que habíamos observado diferencias entre ambos modelos en la bioenergética mitocondrial. Para evaluar el $\Delta\psi_m$ utilizamos la sonda *JC-1*. Esta sonda es sensible al $\Delta\psi_m$, de forma que en células hipopolarizadas *JC-1* se localiza principalmente en el citosol como monómeros que emiten fluorescencia verde, mientras que en células hiperpolarizadas *JC-1* forma agregados en la mitocondria que emiten fluorescencia roja. Así, calculando el cociente entre la fluorescencia verde (λ de emisión a 530 nm) y roja (λ de emisión a 585 nm) podemos saber el estado del $\Delta\psi_m$ de las células.

Mediante citometría de flujo determinamos que el cociente de fluorescencia verde/roja era similar para las células control y las deficitarias en *GDAP1*. Sin embargo las células con disminución de frataxina presentaban un cociente de fluorescencia verde/roja superior (**Figura 23**). Este aumento significativo del cociente de fluorescencia verde/roja con respecto al control *pLKO.1-NT* nos indicaba que las células deficientes en frataxina presentaban una disminución del $\Delta\psi_m$. El $\Delta\psi_m$ es un indicador de la actividad de la respiración mitocondrial, y el resultado obtenido correlacionaba con una disfunción en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, en la producción de ATP y en el consumo de oxígeno observados en las células deficientes en frataxina.

Estos resultados nos sugerían que la disminución en los niveles de frataxina en las células SH-SY5Y afectaba al metabolismo energético mitocondrial causando una despolarización de la membrana mitocondrial interna como consecuencia de una alteración en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Un déficit en el transporte de electrones produce la disipación del $\Delta\psi_m$, necesario para la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa en la respiración mitocondrial, por lo que la cantidad de ATP generada en las células deficientes de frataxina se veía reducida.

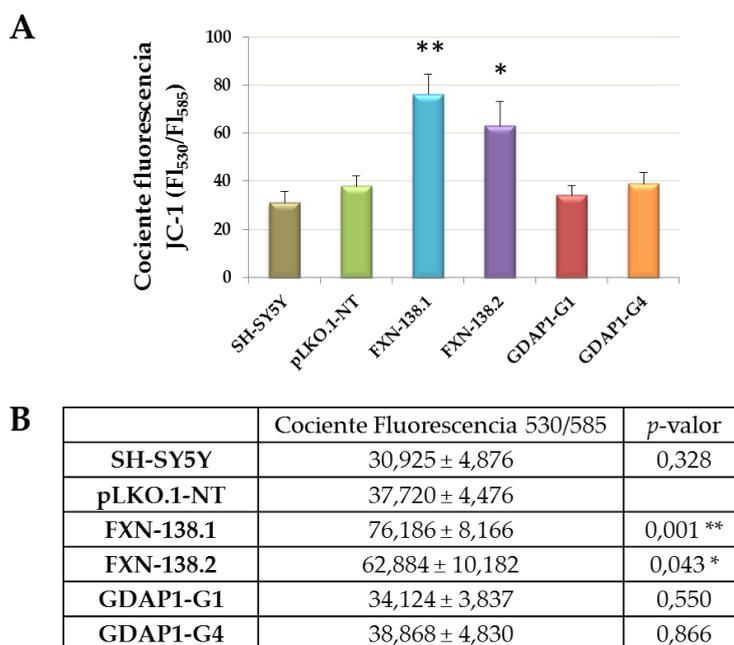


Figura 23. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial en los clones SH-SY5Y por citometría de flujo. **A)** El cociente de fluorescencia verde/roja de los diferentes clones mostraba diferencias significativas entre las células deficientes en frataxina y el control pLKO.1-NT. El incremento del cociente de fluorescencia en las células deficientes en frataxina indicaba una despolarización del $\Delta\psi_m$. **B)** Valores promedio \pm SEM del cociente de fluorescencia verde/roja promedio en cada uno de los clones. Significatividad * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al control pLKO.1-NT.

7. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 causan alteraciones en la morfología mitocondrial.

La función de GDAP1 se ha relacionado con el mantenimiento de la red mitocondrial (Niemann *et al.*, 2005; Pedrola *et al.*, 2005; Pla-Martin *et al.*, 2013). La sobreexpresión transitoria de GDAP1 en células HeLa (Niemann *et al.*, 2005; Pedrola *et al.*, 2005; Pedrola *et al.*, 2008) y en células COS-7 (Pla-Martin *et al.*, 2013) causa la fragmentación de mitocondrias, lo que sugiere que GDAP1 participa en procesos de dinámica mitocondrial, concretamente induciendo la fisión de mitocondrias en estas células.

Quisimos investigar los procesos de fusión y fisión mitocondrial en situación de déficit de GDAP1 y compararlos frente al déficit de frataxina. Para esto, marcamos las células con un anticuerpo anti-citocromo *c* para poder evaluar la arquitectura mitocondrial. Para describir los posibles cambios en la forma y organización de las mitocondrias establecimos 4 tipos de red mitocondrial en las células SH-SY5Y: red mitocondrial fragmentada, constituida mayoritariamente por pequeñas mitocondrias redondeadas, red mitocondrial vesicular, constituida por pequeños segmentos de mitocondrias tubulares, red mitocondrial tubular, constituida mayoritariamente por mitocondrias alargadas y fusionadas, y red mitocondrial mixta, que consiste en una mezcla de red mitocondrial vesicular y tubular (**Figura 11 del apartado 8 de Materiales y Métodos**). Tras clasificar las células según la red mitocondrial que presentaban, observamos que la mayoría de las células control exhibían un patrón mixto, seguido de un patrón tubular de la red mitocondrial (**Figura 24B**). El déficit de GDAP1 resultaba en un patrón mixto de la red mitocondrial, similar al observado en los controles, seguido de una red mitocondrial vesicular y menor proporción de células con morfología mitocondrial tubular (**Figura 24B**). El silenciamiento de *GDAP1* no causaba por tanto un aumento en la fusión mitocondrial, como cabría esperar al considerar a GDAP1 una proteína implicada en la fisión mitocondrial. Por el contrario, el silenciamiento de *FXN* inducía una morfología mitocondrial tubular en un mayor porcentaje de células (**Figura 24B**).

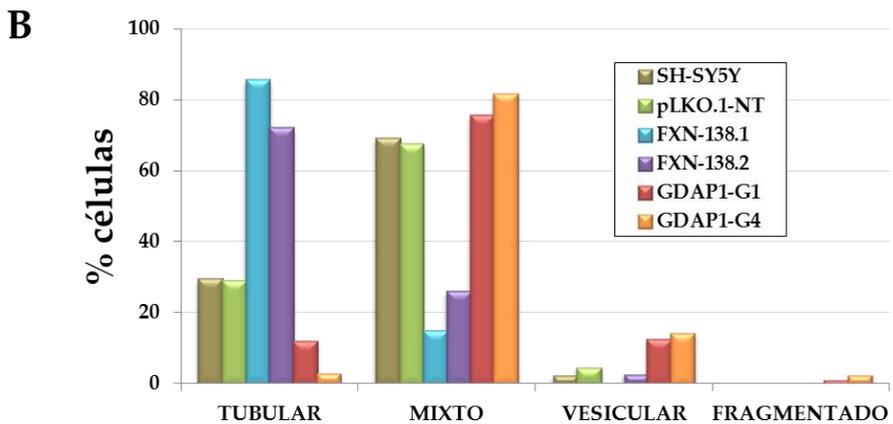
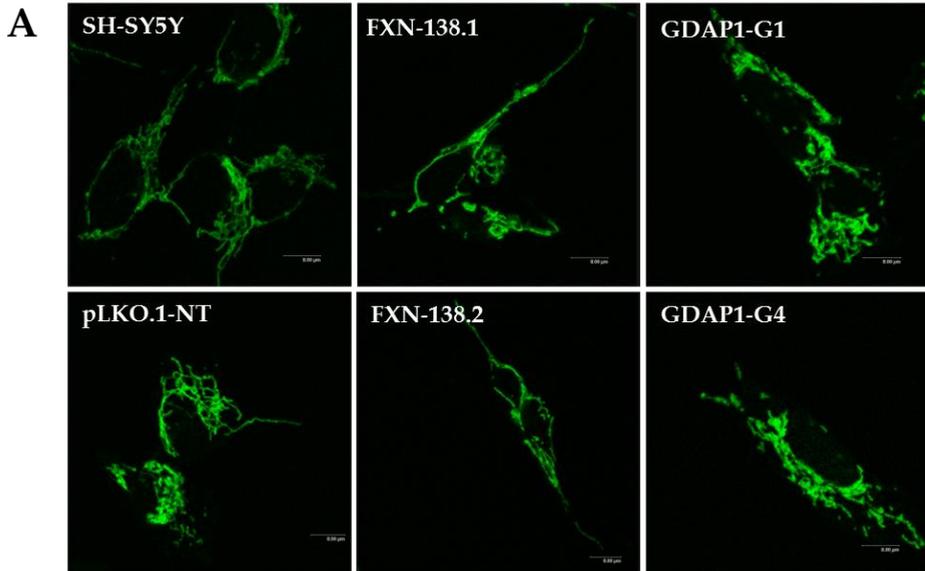


Figura 24. Patrón de la red mitocondrial en los clones SH-SY5Y. A) Imágenes representativas de las diferencias en la morfología mitocondrial entre los distintos clones SH-SY5Y. Los controles exhiben mayoritariamente un patrón mixto, compuesto por mitocondrias con morfología vesicular y tubular. Los clones deficientes en frataxina muestran mayor proporción de células con morfología tubular. Por el contrario, las células deficientes en GDAP1, aunque la mayoría tienen morfología mitocondrial mixta, presentan un incremento en el número de células con morfología vesicular con respecto a las células control, como se muestra en las imágenes, o con patrón fragmentado, prácticamente ausente en las células control o en las deficitarias en frataxina. B) Porcentaje de células con patrón mitocondrial tubular, mixto, vesicular y fragmentado en los distintos clones SH-SHY5Y.

También analizamos el número y la longitud promedio de las mitocondrias en los distintos clones SH-SY5Y. En la **Figura 25B** mostramos la población mitocondrial de cada clon clasificada en 3 grupos según su tamaño: mitocondrias con una longitud menor de 5 μm , mitocondrias con una longitud de entre 5 y 10 μm y mitocondrias con una longitud superior a 10 μm . Observamos diferencias en la longitud de las mitocondrias entre los clones. El déficit de frataxina causaba un aumento en la longitud mitocondrial, como indicaba el mayor porcentaje de mitocondrias con más de 10 μm de longitud. Este dato apoya el elevado porcentaje, más del 70%, de la población de células deficientes en frataxina con morfología mitocondrial tubular (**Figura 24B**). En estas células con un patrón mitocondrial tubular, las mitocondrias forman largos túbulos de longitud superior a 10 μm .

La cuantificación del número promedio de mitocondrias por célula mostró menos mitocondrias en los clones FXN (**Figura 25A**), aunque estas mitocondrias eran más largas (**Figura 25C**). Por otra parte, los clones deficientes en GDAP1 poseían más mitocondrias (**Figura 25A**) pero de menor tamaño, sobre todo el clon con mayor silenciamiento de *GDAP1*, GDAP1-G4 (**Figura 25C**). Estos resultados sugerían que el déficit de frataxina induce la formación de largas mitocondrias tubulares. Sin embargo, el déficit de GDAP1 causa un incremento en el número de células con morfología mitocondrial vesicular y fragmentada, constituidas por un mayor número de mitocondrias pero de menor tamaño que las células control o con déficit de frataxina.

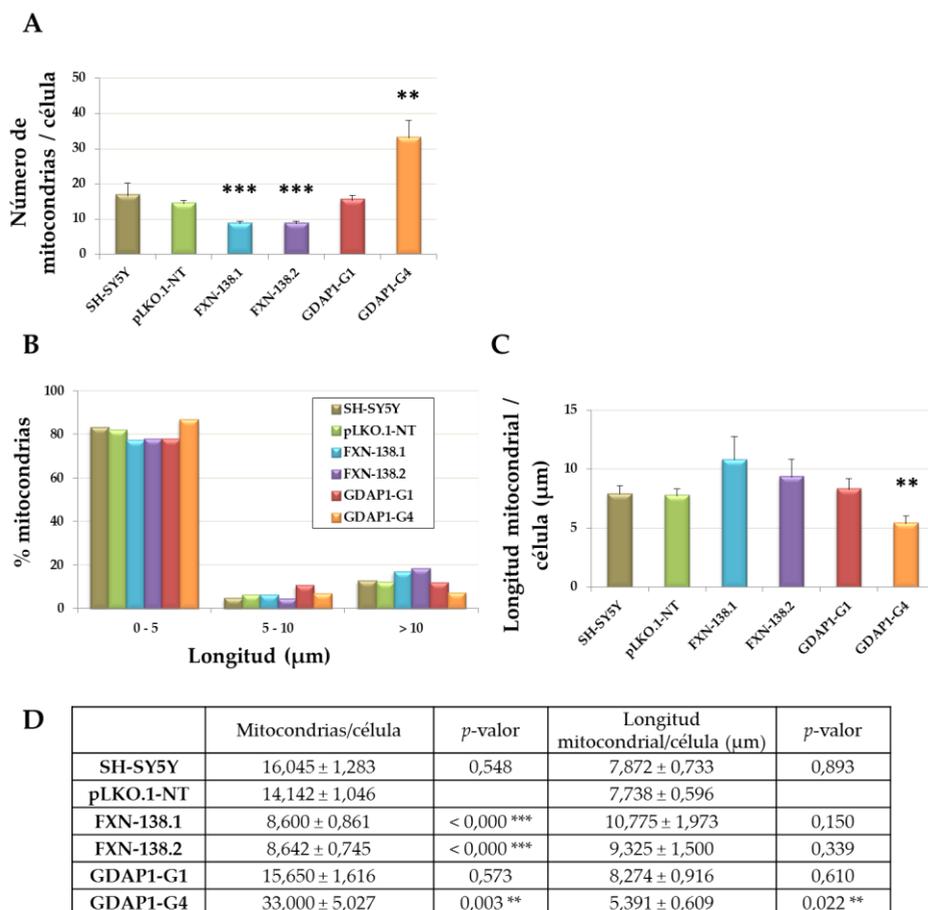


Figura 25. Efecto del silenciamiento de *FXN* y de *GDAP1* en la morfología mitocondrial. **A)** Número promedio de mitocondrias por célula en los clones SH-SY5Y. **B)** Porcentaje de mitocondrias por célula clasificadas en 3 grupos según su longitud en los diferentes clones. **C)** Longitud promedio de mitocondrias por células en los distintos clones SH-SY5Y. El déficit en frataxina causa un menor número de mitocondrias por célula, aunque de mayor longitud que las mitocondrias de las células control. Un déficit acusado de *GDAP1*, como ocurre en el clon GDAP1-G4, causa un incremento en el número de mitocondrias por célula, de menor tamaño que las mitocondrias de las células control. **D)** Valores promedio ± SEM del número de mitocondrias por célula y de la longitud mitocondrial en cada uno de los clones. Significatividad ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ respecto al control pLKO.1-NT.

También analizamos el contenido mitocondrial de los fibroblastos FRDA por cuantificación de la fluorescencia indirecta de citocromo *c* mitocondrial en estas células mediante microscopía confocal. Dicha cuantificación reveló diferencias entre las muestras FRDA. Las células

FRDA 1 poseían un mayor contenido mitocondrial con respecto a su control, mientras que las células FRDA 2 y FRDA 3 no mostraban mayores niveles de citocromo *c* que sus respectivos controles (**Figura 28**). En colaboración con el grupo del Dr. Federico Pallardó observamos en estas muestras elevados niveles de estrés oxidativo asociados a una biogénesis mitocondrial incrementada en las muestras FRDA 1 y 2. Las diferencias genéticas y clínicas entre los 3 pacientes de origen pueden ayudar a explicar estos resultados dispares. Los fibroblastos FRDA 1 y 2 provienen de pacientes con 30 y 36 años respectivamente cuando se realizaron las biopsias. Estos pacientes tienen una edad estimada de aparición de la enfermedad de 26 años, asociada a una forma FRDA de aparición tardía. Por el contrario, los fibroblastos FRDA 3 provienen de una paciente con una edad estimada de debut de 8 años, que aunque está asociado con formas más graves de FRDA, a la edad en que se le realizó la biopsia, a los 13 años, aún no había desarrollado síntomas como miocardiopatía. Con estos datos, los resultados nos sugerían que el incremento en los niveles de especies reactivas del oxígeno y los defectos en la fosforilación oxidativa observados en estas muestras debía ser una característica temprana de la fisiopatología celular asociada al déficit de frataxina. Sin embargo, la respuesta celular de biogénesis mitocondrial debía ser un fenómeno tardío asociado a la edad y evolución de la enfermedad, viéndose incrementada conforme aumenta la edad del paciente y se desarrolla la enfermedad.

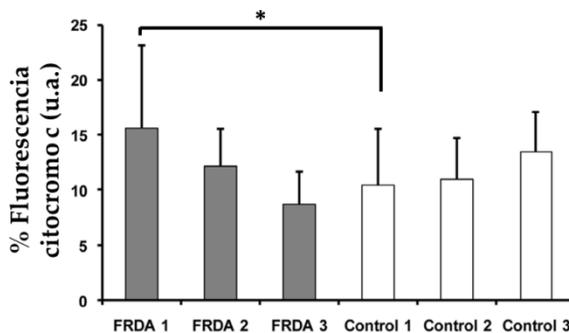


Figura 28. Contenido mitocondrial en fibroblastos FRDA. El contenido mitocondrial en fibroblastos FRDA y controles sanos se midió por cuantificación de la fluorescencia indirecta de citocromo *c* por microscopía confocal. Los resultados representan la media \pm SD de la cuantificación de fluorescencia de 180 células. El contenido mitocondrial en las células FRDA 1 era significativamente superior al de su control Control 1 ($p \leq 0,05$).

Las imágenes de microscopía electrónica del clon FXN-138.1 confirmaron el patrón mitocondrial tubular observado previamente por inmunofluorescencia en estas células deficitarias de frataxina. Mientras que el control pLKO.1-NT presentaba mitocondrias redondeadas y de menor tamaño (**Figura 26A-B**), en el clon con mayor déficit de la proteína frataxina observamos mitocondrias más largas que las de las células control, que llegan a formar largos túbulos y una morfología alterada de las mitocondrias (**Figura 26C-D**). También quisimos comparar los resultados obtenidos por inmunofluorescencia de las mitocondrias de células deficientes en GDAP1 con resultados previos de microscopía electrónica en el clon GDAP1-G4 (Pla-Martin *et al.*, 2013). Observamos que estas células deficientes en GDAP1 presentaban mitocondrias más pequeñas que las del control pLKO.1-NT (**Figura 27**), lo que apoyaba nuestro resultado de una menor longitud de las mitocondrias por célula en el clon GDAP1-G4.

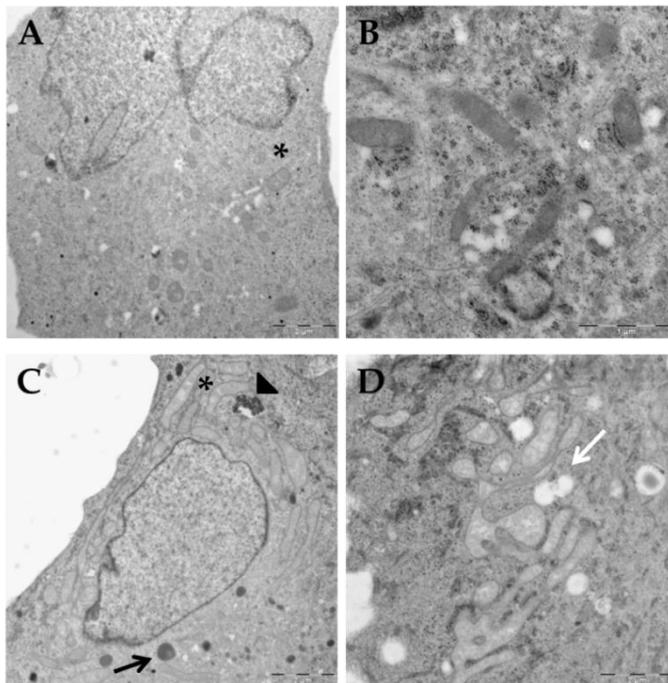


Figura 26. Imágenes de microscopía electrónica del control pLKO.1-NT (A-B) y del clon FXN-138.1 (C-D) que muestran mitocondrias normales y largos túbulos mitocondriales respectivamente (*). Se aprecia el incremento de fusión de la red mitocondrial de las células deficitarias en frataxina. Se observa además un mayor

contenido en lisosomas en estas células (flecha negra), con cuerpos residuales (cabeza de flecha) y vacuolas (flecha blanca).

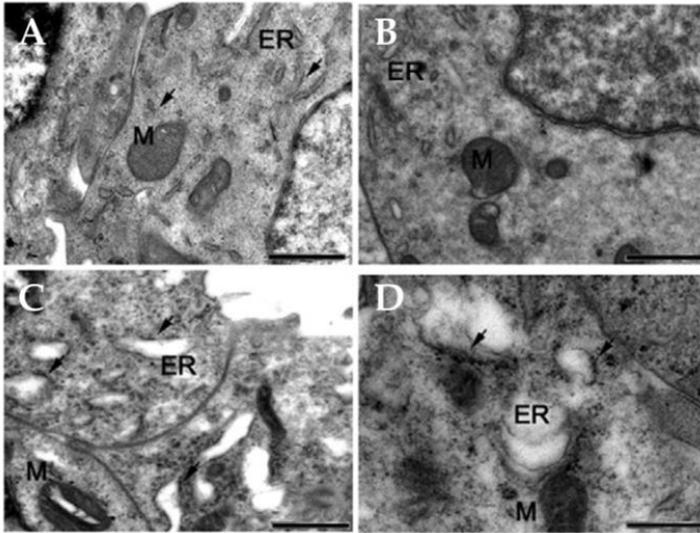


Figura 27. Imágenes de microscopía electrónica del control pLKO.1-NT (A-B) y del clon GDAP1-G4 (C-D) donde se aprecian diferencias en las mitocondrias de ambos tipos de células. Las células control presentan mitocondrias pequeñas y redondeadas, de aspecto normal (A-B), mientras que en las células deficientes en GDAP1 (C-D) las mitocondrias son de menor tamaño y con un aspecto más electrodenso que en las células control. ER, retículo endoplasmático; M, mitocondria. Adaptado de Pla-Martín *et al* (2013).

8. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 causan un aumento del estrés oxidativo celular.

En diferentes modelos de déficit de frataxina y en muestras de pacientes FRDA se ha observado que la disminución de frataxina causa un aumento en la producción de radicales libres generando estrés oxidativo (Ristow *et al.*, 2003; Al-Mahdawi *et al.*, 2006; Vazquez-Manrique *et al.*, 2006; Llorens *et al.*, 2007; Sparaco *et al.*, 2009). Quisimos comprobar si el déficit de frataxina también causaba en nuestro modelo celular un aumento en el estrés oxidativo y comparar esta situación con el déficit de GDAP1. Para esto analizamos directamente los efectos de un aumento en los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Uno de sus efectos a nivel celular es que pueden interactuar con proteínas causando su carbonilación. Decidimos cuantificar el estado de

carbonilación de proteínas en situación basal mediante un *Oxyblot*TM. Observamos que, mientras los dos controles poseían niveles similares de carbonilación de proteínas, las células deficientes en frataxina y en GDAP1 poseían un aumento en la señal de proteínas carboniladas (**Figura 29A**). Los clones FXN mostraban un aumento del doble de los niveles del control pLKO.1-NT, y los clones GDAP1-G1 y GDAP1-G4 un aumento de 2 y 1,5 veces los niveles del control pLKO.1-NT respectivamente.

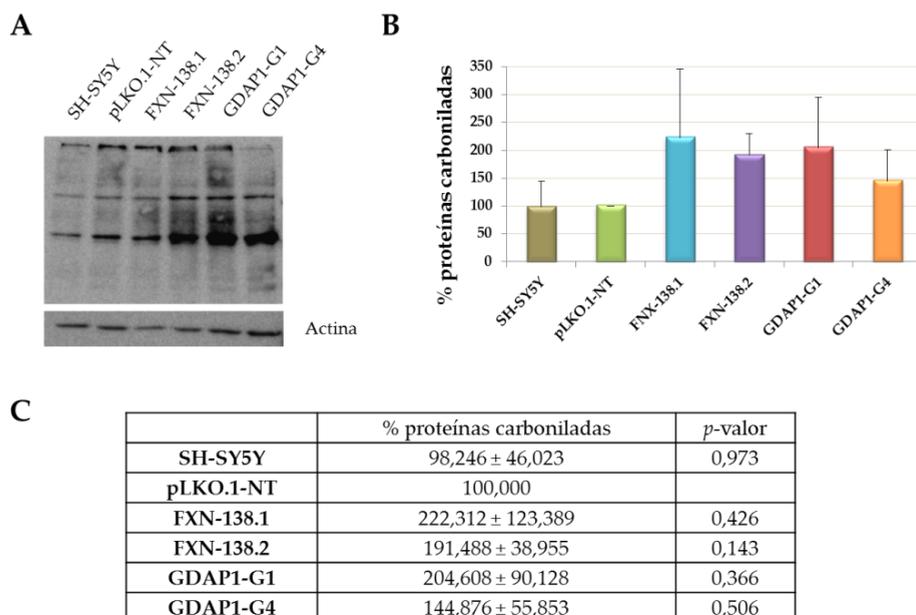


Figura 29. Análisis de proteínas carboniladas en los diferentes clones SH-SY5Y.

A) Imagen representativa de un *Oxyblot*TM realizado sobre extractos proteicos totales de los distintos clones en condiciones basales para determinar los niveles de carbonilación de proteínas por ROS. Los clones deficientes en frataxina y en GDAP1 poseían mayores niveles de proteínas carboniladas comparado con los controles. **B)** El porcentaje de proteínas carboniladas se calculó midiendo la intensidad de señal de cada carrera relativizada a la señal de actina como control de carga. Los valores finales (**C**) se representaron como el porcentaje respecto a los valores del control pLKO.1-NT.

La cadena de transporte de electrones mitocondrial es la principal generadora de ROS en la célula, y en particular la formación del anión superóxido (O_2^-). Para la detección *in vivo* del O_2^- en los clones SH-SY5Y usamos la sonda *MitoSOX*TM, que se dirige selectivamente a las mitocondrias de las células y emite fluorescencia al oxidarse en presencia

del O_2^- . Marcamos las células con *MitoSOX*TM y una vez fijadas cuantificamos la fluorescencia emitida a λ 580 nm en cada uno de los clones SH-SY5Y. Como control positivo de estrés oxidativo tratamos las células pLKO.1-NT con H_2O_2 . Las mitocondrias de las células control exhibían una fluorescencia mínima por oxidación de la sonda *MitoSOX*TM, mientras que los clones deficientes en frataxina, los deficientes en GDAP1 y el control positivo de estrés oxidativo exhibían mucha mayor fluorescencia roja, lo que indicaba la presencia del O_2^- (Figura 30).

Conjuntamente, estos resultados nos indicaban que en condiciones basales, el déficit de las proteínas frataxina y GDAP1 causaba una elevada producción de ROS produciendo un aumento en los niveles de estrés oxidativo celular.

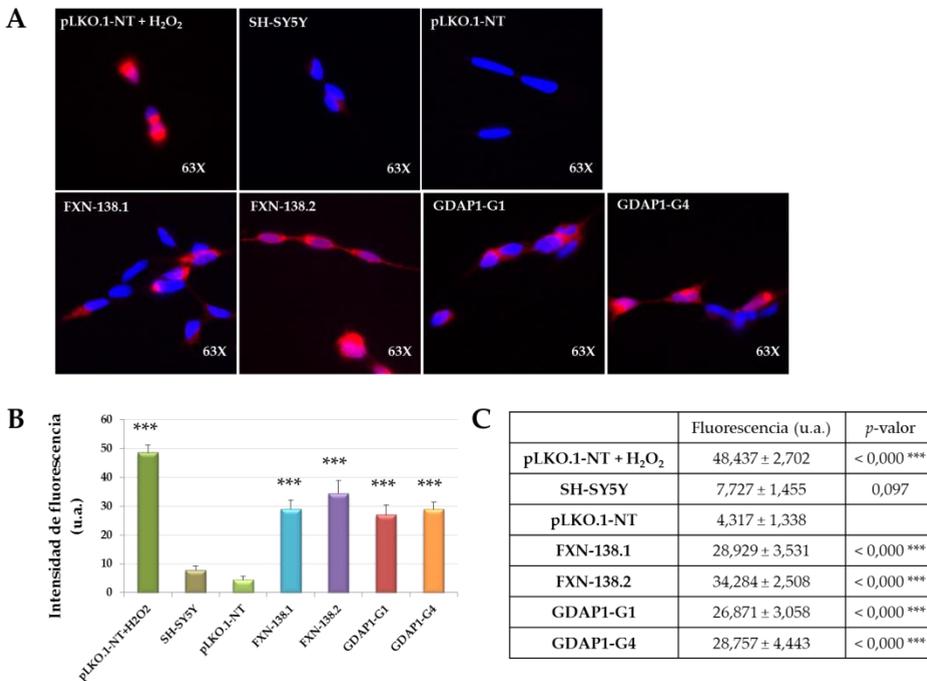


Figura 30. Detección de los niveles de anión superóxido en las células SH-SY5Y mediante la sonda *MitoSox*TM. **A)** Las imágenes de microscopía muestran una fluorescencia mínima de los controles, mientras que la fluorescencia de las células deficientes en frataxina y en GDAP1 es mayor, al igual que la del control positivo. **B)** Cuantificación del nivel de fluorescencia roja emitida por la sonda *MitoSOX*TM oxidada en presencia de O_2^- mitocondrial relativa al área celular. Los resultados muestran los altos niveles de O_2^- en las células deficientes en frataxina y en GDAP1

comparados con los controles. C) Valores promedio \pm SEM de fluorescencia en los diferentes clones. Significatividad $***p \leq 0,001$ respecto al control pLKO.1-NT.

Los niveles intracelulares de ROS están regulados por las enzimas antioxidantes superóxido dismutasas (SODs). Las enzimas MnSOD en la matriz mitocondrial y CuZnSOD en el citosol regulan tanto la producción como la eliminación de ROS. Ambas catalizan la conversión de O_2^- en H_2O_2 y O_2 . El H_2O_2 es destoxificado después por la enzima catalasa en H_2O y O_2 o por enzimas glutatión peroxidadas en glutatión reducido y H_2O (Andreyev *et al.*, 2005; Balaban *et al.*, 2005). Dado que el déficit en frataxina y en GDAP1 causaba un estrés oxidativo en las células, decidimos evaluar por *Western Blot* los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes CuZnSOD, MnSOD y catalasa. La cuantificación de los niveles de enzimas antioxidantes mostraron ligeras diferencias entre los clones deficientes en frataxina y GDAP1 con respecto a los controles. Los clones FXN-138.2 y GDAP1-G1 presentaban mayores niveles de expresión de MnSOD (**Figura 31A**), aunque estas diferencias no eran significativas. Por otra parte, los niveles de CuZnSOD estaban aumentados en los clones deficientes en las proteínas mitocondriales (**Figura 31B**), siendo este aumento significativo para el clon FXN-138.1 y ambos clones deficientes en GDAP1. Por último, los niveles de expresión de catalasa eran similares para todos los clones SH-SY5Y (**Figura 31C**). Estos resultados nos indicaban que aunque el déficit de las proteínas frataxina y GDAP1 causaba un aumento en los niveles celulares de estrés oxidativo, en condiciones basales las células no eran capaces de destoxificar los niveles de ROS con ligeros aumentos en su respuesta antioxidante.

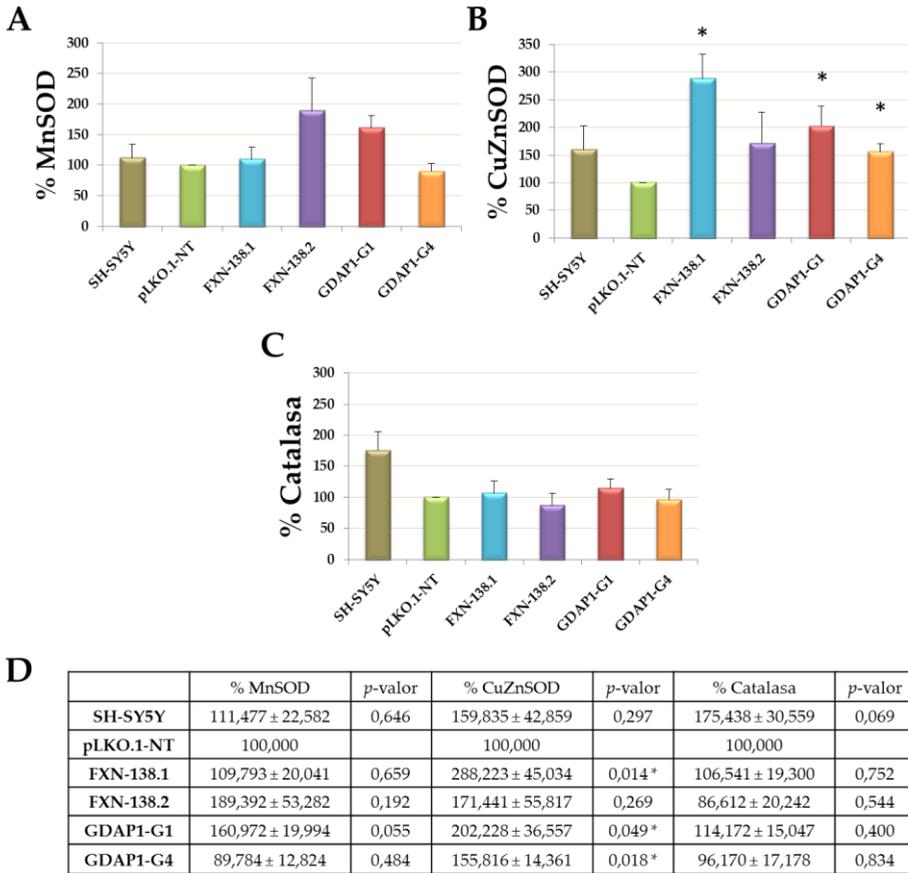


Figura 31. Análisis de los niveles de enzimas antioxidantes. Los niveles de proteínas MnSOD (A), CuZnSOD (B) y catalasa (C) analizados por *Western Blot* se expresaron como porcentajes de los niveles del control pLKO.1-NT. Únicamente observamos un aumento significativo en los niveles de la enzima antioxidante CuZnSOD en el clon FXN-138.1 y ambos clones deficientes en GDAP1. **D)** Valores promedio ± SEM de los niveles de MnSOD, CuZnSOD y catalasa en los diferentes clones, expresados como porcentaje con respecto a los niveles del control pLKO.1-NT. Significatividad * $p \leq 0,05$ respecto al control pLKO.1-NT.

9. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 incrementan el proceso de autofagia.

Dado que los clones deficientes en frataxina y en GDAP1 presentaban niveles aumentados de estrés oxidativo, y que ninguno de estos clones exhibía muerte celular como respuesta a la señal oxidativa, nos

preguntamos si estas células presentaban alteración de otros procesos celulares dedicados a contrarrestar estados celulares nocivos.

La autofagia es un proceso celular que permite el reciclaje de proteínas y orgánulos para el mantenimiento de la homeostasis celular (Cuervo, 2008). En concreto la macroautofagia permite eliminar selectivamente macromoléculas y orgánulos celulares mediante la formación de vesículas de doble membrana, los autofagosomas, que secuestran componentes citoplasmáticos. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas formando autofagolisosomas que degradan el contenido de los autofagosomas por la acción de enzimas hidrolíticos lisosomales (Tanida, 2011). La autofagia tiene una función básica en el mantenimiento celular en condiciones normales, pero además puede actuar como un mecanismo de defensa frente a las lesiones que ocasiona un estrés oxidativo, facilitando la eliminación de orgánulos dañados (Kiffin *et al.*, 2006; Mizushima *et al.*, 2008; Tatsuta & Langer, 2008).

LC3B es la proteína mejor caracterizada empleada como marcador de autofagosomas que se originan durante la autofagia (Klionsky *et al.*, 2007). LC3B se lipidifica originando la forma LC3B-II, que se localiza específicamente en la membrana de los autofagosomas. El análisis de los niveles proteicos de LC3B-II se utiliza como marcador del proceso de autofagia, por lo que decidimos analizar su nivel de expresión en los distintos clones SH-SY5Y en condiciones basales. El estudio por *Western Blot* reveló un aumento en los niveles de LC3B-II en los clones deficientes en frataxina y en GDAP1 al compararlos con las células control (**Figura 32A-B**).

Dados los elevados niveles de la proteína LC3B-II en los clones con silenciamiento de *FXN* y de *GDAP1*, intentamos confirmar la presencia de vesículas autofágicas por microscopía. Para esto transfectamos los diferentes clones con el plásmido pEGFP-LC3, que permite evaluar la presencia de vesículas con el marcador LC3B-II por fluorescencia verde. Entre las células transfectadas observamos un aumento de agregados GFP-LC3B-II en los clones deficientes en frataxina y en GDAP1 con respecto a las células control transfectadas. En estas células control observamos un menor porcentaje de células transfectadas con agregados GFP-LC3B-II (**Figura 32C-D**). Estos resultados concordaban con los elevados niveles endógenos del marcador autofágico LC3B-II observados en los clones FXN y GDAP1.

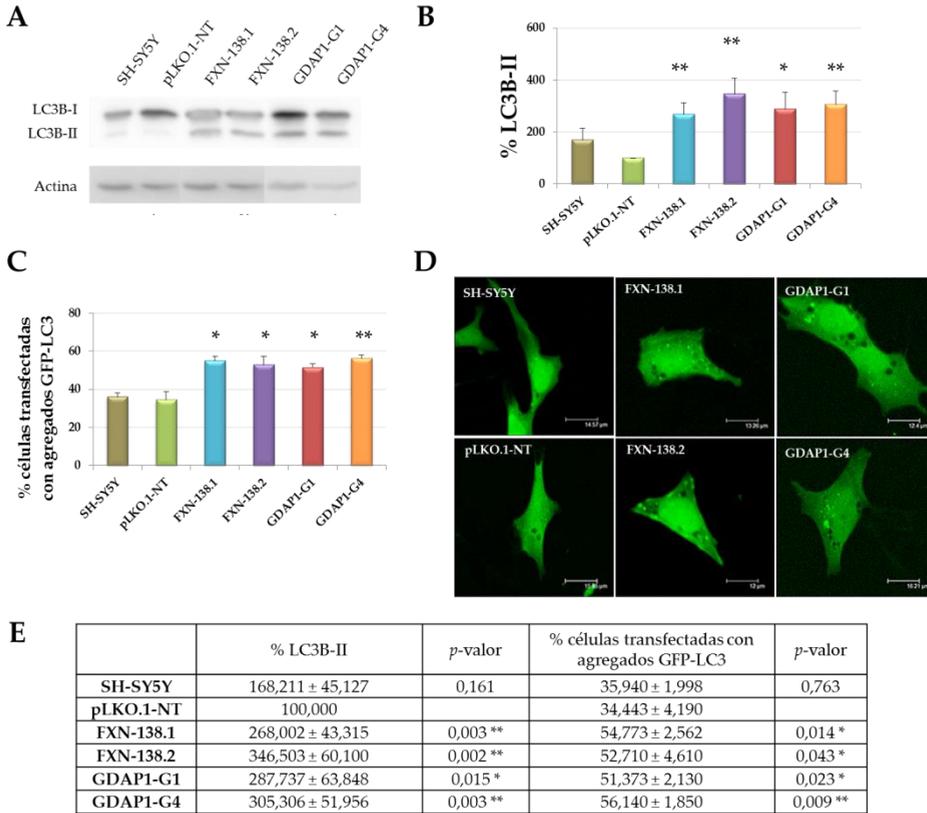


Figura 32. Efecto del déficit de frataxina y de GDAP1 en la formación de vesículas autofágicas. **A)** El análisis por *Western Blot* de los niveles de expresión del marcador de autofagosomas LC3B-II muestra un aumento en los clones deficientes en frataxina y en GDAP1 con respecto a los niveles de las células control. **B)** Cuantificación promedio de los niveles de LC3B-II a partir de extractos proteicos totales de cada uno de los clones respecto a los niveles del control pLKO.1-NT. **C-D)** Transfectamos las células SH-SY5Y con el vector pEGFP-LC3 y examinamos la presencia de vesículas autofágicas GFP-LC3 por microscopía confocal de fluorescencia. Las células deficientes en frataxina y en GDAP1 presentaban más células verdes con vesículas autofágicas, mientras que en los controles encontramos menos células verdes con vesículas autofágicas. **C)** Para cada clon cuantificamos el número de células transfectadas, que exhibían fluorescencia verde, con presencia o ausencia de vesículas GFP-LC3. El resultado, expresado en porcentaje respecto al control pLKO.1-NT, nos confirmó la mayor formación de vesículas autofágicas en las células deficientes en frataxina y en GDAP1. **D)** Imágenes representativas de los diferentes clones SH-SY5Y transfectados con el vector pEGFP-LC3. **E)** Valores promedio ± SEM de los niveles de LC3B-II en todos los clones, expresados como el porcentaje respecto al control pLKO.1-NT, y del porcentaje de células transfectadas que presentan agregados

GFP-LC3 en todos los clones. Significatividad * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ con respecto al control pLKO.1-NT.

El análisis de los niveles de LC3B-II en las muestras de fibroblastos FRDA nos confirmó el aumento de la autofagia basal asociada al déficit de frataxina, aunque sólo fue significativo en los fibroblastos FRDA 1 (**Figura 33**).

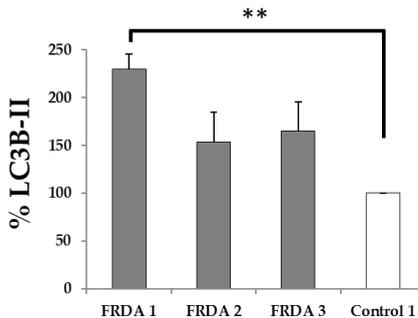


Figura 33. Niveles de LC3B-II en fibroblastos FRDA. Los niveles del marcador de autogagosomas LC3B-II por *Western Blot* de más de 3 extractos proteicos totales diferentes revelan el incremento del proceso basal de autofagia en las células deficitarias en frataxina. Significatividad ** $p \leq 0,01$.

Decidimos evaluar los niveles de otros marcadores autofágicos, como son la proteasa lisosomal catepsina D (Eskelinen, 2005; Tanida, 2011; Hah *et al.*, 2012) y la proteína p62 (Ichimura & Komatsu, 2010; Komatsu & Ichimura, 2010). La proteasa catepsina D se localiza en el interior de los lisosomas, participa en la degradación del contenido lisosomal y también durante la degradación autofágica, en los autofagolisosomas formados al fusionarse los autofagosomas con los lisosomas. El análisis por inmunofluorescencia indirecta de la proteína lisosomal catepsina D reveló en las células deficientes en frataxina y en GDAP1 mayor presencia de agregados vesiculares comparado con los controles (**Figura 34A**). p62 es una proteína multifuncional que une proteínas poliubiquitinadas destinadas a la degradación autofágica, por lo que también se usa como marcador de autofagia. El análisis por *Western Blot* de la expresión de p62 reveló un aumento en los niveles de esta proteína en los clones deficientes en frataxina y en GDAP1 con respecto al control pLKO.1-NT, aunque este aumento no fue significativo (**Figura 34B**).

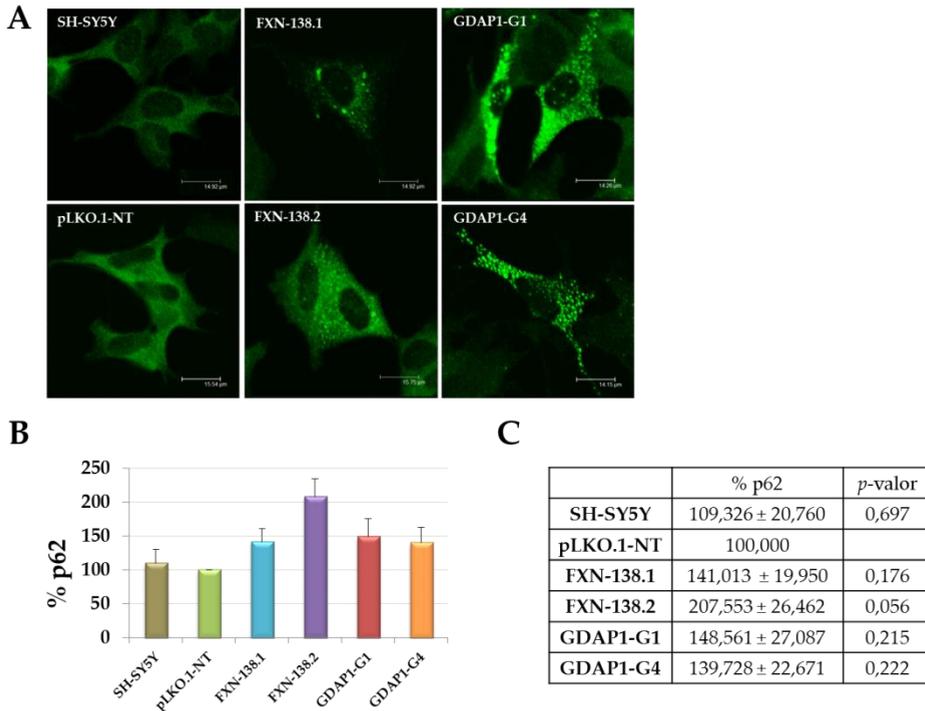


Figura 34. Efecto del déficit de frataxina y de GDAP1 sobre el proceso de autofagia. **A)** Imágenes representativas del marcador autofágico catepsina D en los clones SH-SY5Y. El marcaje de la proteasa lisosomal catepsina D reveló una mayor presencia de agregados proteicos en los clones deficientes en frataxina y GDAP1 al compararlos con los controles. **B)** Los niveles de expresión basales de proteína p62 se analizaron por *Western Blot*. Observamos un aumento en los niveles de p62 en ambos modelos de neuropatía, aunque no significativos, representados para cada clon como el porcentaje respecto al control pLKO.1-NT. **C)** Valores promedio ± SEM de los niveles de p62 en cada clon, expresados como porcentaje respecto a los niveles del control pLKO.1-NT.

Ya que la autofagia basal estaba aumentada en los clones deficientes en frataxina y GDAP1, nos preguntamos si este aumento se debía a una desregulación del proceso autofágico. Para esto evaluamos el estado de la ruta autofágica mediante la inducción de su activación y de su inhibición. Para bloquear el proceso de autofagia tratamos a las células con bafilomicina A1, que impide la acidificación lisosomal, de forma que se previene la degradación del contenido del autofagolisosoma. El bloqueo de la autofagia a este nivel provoca el aumento de los autofagolisosomas, que al no ser degradados, permite detectar un aumento del marcador LC3B-II. También indujimos la autofagia en las

células eliminando el suero del medio de cultivo. Por otra parte inhibimos el proceso autofágico añadiendo insulina o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) al medio de cultivo celular, ya que ambos compuestos son capaces de estimular la ruta mTORC1, cuya activación regula negativamente el proceso de autofagia (Yang & Klionsky, 2010). Tras tratar a las células con estos compuestos, evaluamos por *Western Blot* los niveles del marcador LC3B-II en extractos proteicos totales de los clones SH-SY5Y. Observamos que tanto las células control como los clones deficientes en frataxina y en GDAP1 respondían adecuadamente a los estímulos que regulan la autofagia (**Figura 35A**). Todos los clones mostraban un aumento en los niveles de LC3B-II tras bloquear la autofagia con bafilomicina A1 y en ausencia de suero con respecto a los niveles basales de LC3B-II de cada uno de los clones. Y todos los clones mostraban una disminución con respecto a sus niveles basales del marcador LC3B-II al activar la ruta mTORC1 bloqueando así la autofagia. Estos resultados nos sugerían que la disminución en los niveles de frataxina y GDAP1 no afectaba a la maquinaria de señalización autofágica.

Estos mismos datos los analizamos de diferente manera. En esta ocasión comparamos los niveles del marcador LC3B-II tras cada tratamiento en los diferentes clones con los niveles de LC3B-II del control pLKO.1-NT. De esta forma pudimos observar cómo variaban los niveles de autofagia en las células deficientes en frataxina y en GDAP1 con respecto a los niveles de autofagia del control tras los distintos tratamientos. Observamos que en los clones FXN y GDAP1 los niveles del marcador de autofagosomas LC3B-II eran superiores a los niveles del control pLKO.1-NT en cada condición, confirmando así el aumento significativo en los niveles basales de LC3B-II en ambos modelos de neuropatía. Y en el caso del clon con mayor silenciamiento de FXN, FXN-138.1 los niveles de LC3B-II eran además significativamente superiores al del control pLKO.1-NT ante la situación de privación nutricional (**Figura 35B**).

Conjuntamente, estos resultados nos indicaban que en condiciones basales había un aumento en los niveles de autofagia en ambos modelos de neuropatía. Además, la presencia de numerosas vesículas lisosomales observadas por microscopía electrónica en el clon FXN-138.1 (**Figura 26B**) puede estar relacionada con el aumento de la autofagia basal. Este incremento de la autofagia nos sugería que las células deficientes en

frataxina y en GDAP1 presentaban una activación del proceso de autofagia probablemente como respuesta a un daño celular como el estrés oxidativo y/o un déficit bioenergético. De esta forma la autofagia ejercería un papel protector en las células cuando la disminución de los niveles de las proteínas frataxina y GDAP1 compromete la homeostasis celular.

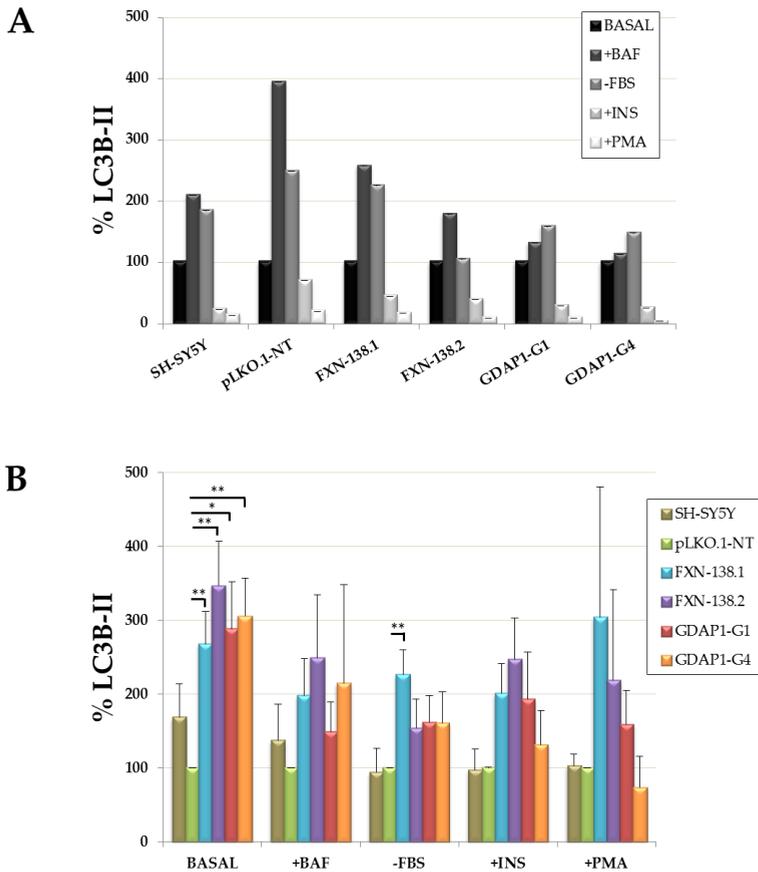


Figura 35. Regulación del proceso de autofagia. A) Se evaluó la respuesta autofágica de los distintos clones SH-SY5Y ante diferentes estímulos: bafilomicina A1 0,1 μ M, ausencia de FBS en el medio de cultivo, insulina 100 nM y PMA 1 μ M. Los niveles del marcador de autofagosomas LC3B-II en las diferentes condiciones con respecto a los niveles de LC3B-II en condiciones basales en cada uno de los clones reveló un flujo autofágico correcto en todos ellos. **B)** Sin embargo, la cuantificación del marcador LC3B-II en cada uno de los clones tras cada tratamiento con respecto a los niveles de LC3B-II del control pLKO.1-NT tras cada tratamiento evidenció un aumento en los niveles de LC3B-II en los clones deficientes en frataxina y en GDAP1. Significatividad * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al control pLKO.1-NT.

10. Alteración de la ruta mTOR en las células deficientes en frataxina.

A pesar de que el flujo autofágico era normal a través de la ruta mTOR, decidimos evaluar el estado de dicha ruta. La ruta mTOR (*mammalian target of rapamycin*) se regula por diversos factores como pueden ser factores de crecimiento, hormonas, disponibilidad de nutrientes, el balance energético celular o por estrés (Zoncu *et al.*, 2011). Ante un estímulo mitogénico, por ejemplo, el complejo mTOR-C1 es activado por la proteína Akt. La activación de mTOR conlleva su fosforilación, lo que desencadena la fosforilación de la kinasa p70S6, que a su vez fosforila a la proteína ribosomal rpS6. La fosforilación de S6 provoca su reclutamiento en la subunidad ribosomal 40S, activándose la traducción de proteínas implicadas en la síntesis proteica (Hay & Sonenberg, 2004).

Para comprobar el estado de la ruta mTOR en nuestro modelo celular analizamos por *Western Blot* los niveles de las proteínas mTOR, mTOR fosforilada en el residuo S2448, p70S6K, p70S6K fosforilada en el residuo Thr389, rpS6 y rpS6 fosforilada en los residuos S235 y S236. Analizamos estas proteínas en condiciones basales y forzando su activación por fosforilación en presencia de insulina 100 nM en el medio de cultivo celular durante 90 minutos, o su inhibición por ausencia de fosforilación al retirar el suero del medio de cultivo celular toda la noche.

En condiciones de privación nutricional la ruta mTOR quedaba inhibida, como comprobamos por la ausencia de fosforilación de las proteínas de la ruta (**Figura 36, panel – FBS**). Sin embargo, al añadir insulina al medio de cultivo celular para activar la ruta mTOR, esta activación era incompleta en el caso de las células deficientes en frataxina, donde observamos una considerable disminución de los niveles de la proteína rpS6 fosforilada (**Figura 36, panel + Insulina 100 nM**). Este resultado nos pareció muy interesante puesto que algunos pacientes de ataxia de Friedreich desarrollan diabetes, bien porque no producen insulina o bien por resistencia a la insulina (Cnop *et al.*, 2013). En relación con esto, nos preguntamos si en nuestro modelo celular de déficit de frataxina la alteración de la ruta mTOR, por afectación en la fosforilación de la proteína rpS6 en los residuos S235 y S236, podía ser debida a una respuesta incorrecta ante la señal de insulina específicamente por parte de estas células. Para contestar a esta pregunta decidimos evaluar la fosforilación de rpS6 con otro activador descrito para la ruta mTOR, PMA. Después de tratar a las células durante 2 horas

con PMA 1 μ M, observamos en las células deficientes en frataxina los mismos resultados que con insulina, una disminución en los niveles de proteína rpS6 fosforilada (**Figura 36, panel + PMA 1 μ M**). Estos resultados nos confirmaron una alteración en la ruta mTOR en las células deficientes en frataxina, que no se debía a una alteración en la respuesta ante la señal de insulina exclusivamente.

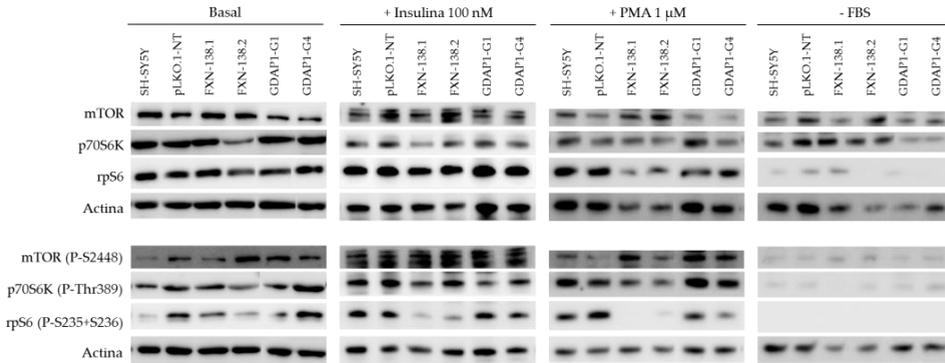


Figura 36. Alteración de la ruta mTOR en las células deficientes en frataxina. La activación de la ruta mTOR con insulina 100 nM o con PMA 1 μ M conlleva la fosforilación de las proteínas mTOR, p70S6K y rpS6. La inhibición de la ruta mTOR en ausencia de FBS impide la fosforilación de dichas proteínas. La ruta mTOR se regula correctamente en las células control y en las deficitarias en GDAP1. Sin embargo, las células deficientes en frataxina muestran unos niveles muy disminuidos de la proteína rpS6 fosforilada cuando dicha fosforilación se fuerza.

11. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 causan estrés de retículo endoplasmático.

En un trabajo previo en el laboratorio se vio que la disminución en los niveles de GDAP1 o la presencia de mutaciones afectaba directamente la relación de la mitocondria con el retículo endoplasmático (RE). Esta alteración condicionaba a las células deficientes en GDAP1 a una mayor susceptibilidad al estrés de RE (Pla Martín, 2012).

El RE es un orgánulo esencial que participa en la síntesis, plegamiento y direccionamiento de proteínas y en la homeostasis del calcio. Diversos factores como la acumulación de proteínas mal plegadas, cambios en el estado redox celular o la alteración de la homeostasis del calcio provocan un estrés de RE que afecta a su correcto funcionamiento. Ante esta

situación el RE activa rutas específicas de señalización incluyendo la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, *unfolding protein response*). La respuesta UPR trata de restablecer los niveles fisiológicos en el RE, destinando a la célula a su supervivencia. Pero si el estrés de RE persiste desencadena una señalización apoptótica (Rao *et al.*, 2004). Diversas proteínas del RE actúan como sensores de estrés de RE, que en condiciones normales permanecen unidas a la chaperona BIP/Grp78. Pero cuando se produce una acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, se favorece la liberación de BIP/Grp78 de estos sensores para unirse a las proteínas mal plegadas, lo que desencadena la activación de los sensores, produciendo una cascada de señalización que es la respuesta UPR (Shimizu & Hendershot, 2009).

Nuestros resultados muestran que tanto las células deficientes en frataxina como en GDAP1 presentaban un elevado estrés oxidativo. Mientras que el déficit de frataxina causaba alteraciones en la bioenergética mitocondrial, lo cual podría ser la causa del aumento en el estrés oxidativo, en las células deficientes en GDAP1, el origen de dicho estrés oxidativo estaría desencadenado por la incorrecta comunicación entre la mitocondria y el RE. Pero ya que una disfunción mitocondrial también puede causar la aparición de estrés de RE (Lim *et al.*, 2009), decidimos evaluar si el déficit de frataxina repercutía en el estado de estrés del RE al igual que sucede ante el déficit de GDAP1. Para esto, analizamos los niveles de la chaperona BIP/Grp78, cuyos niveles aumentan al activarse la respuesta UPR, en condiciones basales e induciendo estrés de RE con tapsigarguina. Mientras que en condiciones basales esta proteína no estaba incrementada, tras el tratamiento con tapsigarguina 1 μM los niveles de BIP/Grp78 aumentaron considerablemente en las células deficientes en frataxina en comparación a cómo lo hacía en los controles, al igual que ocurría en las células deficientes en GDAP1 (**Figura 37**)

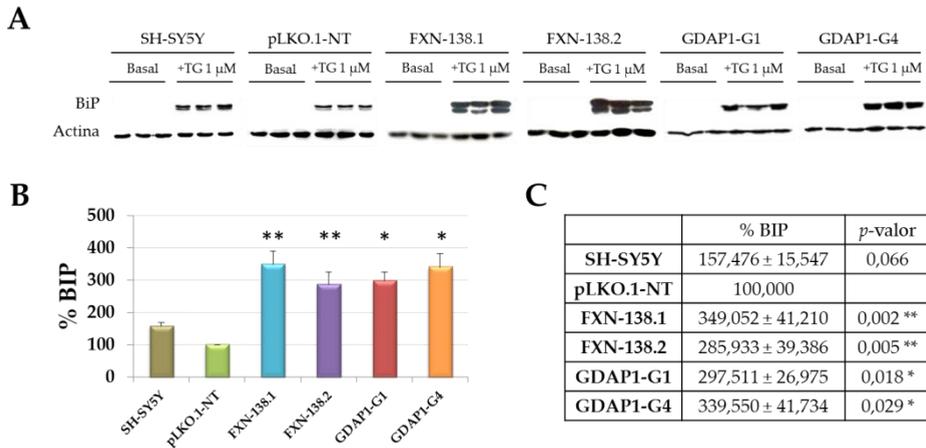
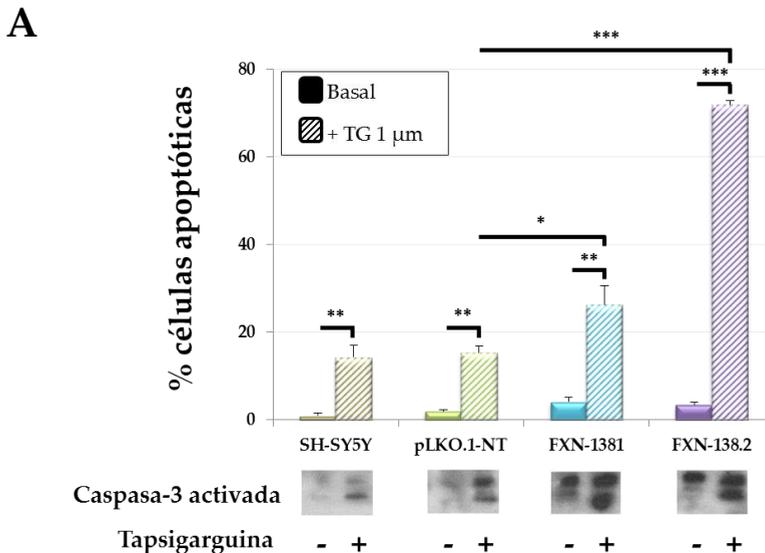


Figura 37. El déficit de frataxina y de GDAP1 incrementa la susceptibilidad a estrés de retículo endoplasmático (RE). **A)** El análisis por *Western Blot* de los niveles de BIP como marcador de estrés de RE revela su ausencia en condiciones basales y su aumento tras inducir su expresión con tapsigarguina en todos los clones. Sin embargo, el aumento en los niveles de BIP en condiciones de estrés de RE era significativamente superior en los clones FXN y GDAP1 comparados con los controles. **B)** Cuantificación relativa de los niveles de BIP tras su inducción con tapsigarguina respecto a los niveles del control pLKO.1-NT. **C)** Valores promedio \pm SEM de los niveles de BIP para cada uno de los clones, expresados como porcentaje con respecto a los valores del control pLKO.1-NT. Significatividad * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ respecto al control pLKO.1-NT.

Bajo condiciones prolongadas de estrés, la respuesta UPR puede inducir apoptosis (Rao *et al.*, 2004). Por esto decidimos evaluar si el déficit de frataxina causaba un aumento en la muerte celular ante un estrés de RE persistente. Mediante citometría de flujo, analizamos la presencia de células apoptóticas en los distintos clones, en condiciones basales y tras causar estrés de RE con tapsigarguina 1 μ m. Como se muestra en la **Figura 38**, la tapsigarguina inducía muerte celular tanto en las células control como en los clones FXN, pero la apoptosis era significativamente mayor en las células con déficit de frataxina. Estos resultados fueron corroborados por *Western Blot* mediante la detección de la proteína caspasa-3 activada. Los niveles de caspasa-3 activada eran superiores en las células deficientes en frataxina que en las células control tras inducir estrés de RE con tapsigarguina (**Figura 38, panel inferior**), lo que confirmaba que el déficit de frataxina causaba una mayor susceptibilidad al estrés de RE induciendo la apoptosis.

En el caso de las células deficientes en GDAP1, el tratamiento con tapsigarguina causaba los mismos niveles de células apoptóticas que en las células control. Sin embargo, al tratar a las células con tapsigarguina y con bafilomicina A1 se obtenía mayor proporción de células apoptóticas deficitarias en GDAP1. Estos resultados sugerían que ante un estrés de RE, el déficit de GDAP1 inducía la autofagia como mecanismo protector frente a dicho estrés, pero cuando la autofagia se bloqueaba, al tratar a las células con bafilomicina A1, éstas no eran capaces de solventar el estrés de RE, y acababan muriendo por apoptosis (Pla Martín, 2012).



B

	% células apoptóticas	<i>p</i> -valor (BASAL vs +TG)	<i>p</i> -valor (vs pLKO.1-NT)
SH-SY5Y	1,067 ± 0,426	0,007 **	0,191
SH-SY5Y + TG	14,300 ± 2,651		0,745
pLKO.1-NT	1,967 ± 0,384	0,001 **	
pLKO.1-NT +TG	15,367 ± 1,530		
FXN-138.1	4,133 ± 1,050	0,002 **	0,099
FXN-138.1+TG	26,350 ± 4,251		0,050 *
FXN-138.2	3,435 ± 0,498	< 0,000 ***	0,080
FXN-138.2+TG	71,893 ± 0,903		< 0,000 ***

Figura 38. Aumento de apoptosis en las células deficientes en frataxina por mayor susceptibilidad al estrés de RE. A) Cuantificación de células apoptóticas por citometría de flujo en condiciones basales y tras la inducción de estrés de RE

con taspigarguina 1 μ M. Se comparó la población de células apoptóticas antes y después del tratamiento dentro de un mismo clon celular y entre ellos. Dicha comparación reveló que el déficit de frataxina hacía a las células más sensibles al estrés de RE, al producirse mayor muerte celular tras el tratamiento con taspigarguina. Esta cuantificación se validó mediante *Western Blot* por el incremento de señal de caspasa-3 activada, como se muestra en el panel inferior a la gráfica. **B)** Porcentaje de células apoptóticas en condiciones basales y tratadas con taspigarguina en cada uno de los clones. Significatividad * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ entre el valor de un mismo clon con y sin taspigarguina o respecto al control pLKO.1-NT.

12. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 afectan la homeostasis de calcio.

La mitocondria juega un importante papel en la homeostasis de calcio. Gracias a su dinámica es capaz de localizarse en compartimentos subcelulares donde se requiere la liberación de calcio o su tamponamiento. La comunicación de la mitocondria con otros orgánulos también es relevante para llevar a cabo determinadas funciones fisiológicas como la homeostasis del calcio. El retículo endoplasmático (RE) es el principal almacén de calcio en la célula. La comunicación de la mitocondria con este orgánulo es necesaria para un adecuado tamponamiento del calcio en función de las necesidades celulares. Como vieron Pla-Martín y colaboradores (2013) en nuestro laboratorio, el déficit de GDAP1 en la línea SH-SY5Y disminuía la interacción entre la mitocondria y el RE. Una alteración en la comunicación entre estos dos orgánulos afectaba al tamponamiento de calcio por parte de la mitocondria cuando se liberaba calcio del RE, ya que las mitocondrias con déficit en GDAP1 no se localizarían correctamente en zonas cercanas al RE en las que incrementa la concentración local de calcio y donde es necesario un tamponamiento de calcio (Pla-Martin *et al.*, 2013).

Dado que el déficit de frataxina en la línea SH-SY5Y causa alteraciones en la fisiología mitocondrial, quisimos investigar si la disfunción mitocondrial afectaba también al metabolismo celular del calcio. Para esto marcamos las células SH-SY5Y con la sonda *Fura-2 AM*. Esta sonda permanece en el citosol celular y es capaz de unir calcio reversiblemente, de forma que nos permite detectar cambios en los niveles de calcio del citosol. Posteriormente sometimos a las células SH-SY5Y al efecto de diferentes compuestos que provocan un aumento en la concentración

citosólica de calcio, y estudiamos la capacidad tamponadora de los diferentes clones SH-SY5Y.

La veratridina es un compuesto que previene la inactivación de los canales iónicos de Na^+ en la membrana plasmática, provocando que estos canales permanezcan abiertos. El incremento en la permeabilidad al Na^+ causa una despolarización de la membrana plasmática, cambiando el potencial de membrana hasta un umbral cercano al necesario para la activación de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje, causando la entrada de Ca^{2+} desde el exterior de la célula.

Tras exponer a las células a veratridina 25 μM observamos un aumento en la concentración citosólica de calcio en todos los clones. Sin embargo, observamos un pico de entrada de calcio menor en las células deficientes en frataxina y en GDAP1 que en los controles (**Figura 39A**). Estas diferencias en la entrada de calcio extracelular podrían deberse a diferencias en los canales de calcio de la membrana plasmática entre los distintos clones. Por ejemplo, si las células deficientes en frataxina y en GDAP1 tuvieran menor sensibilidad a la veratridina que las células control, la misma concentración de veratridina causaría menor despolarización en las células deficitarias, entrando menos calcio en estas células que en las células control.

Ante un incremento en la concentración citosólica de calcio, las células han de restablecer los niveles de calcio. Observamos que las células control eran capaces de disminuir dichos niveles. Sin embargo, las células deficientes en frataxina no eran capaces de restablecer los niveles de calcio en el citosol, lo que sugería un defecto en el proceso de tamponamiento de calcio intracelular (**Figura 39A**). Observamos además que las células deficientes en GDAP1 se comportaban de manera similar a las células deficientes en frataxina, confirmando así la alteración en la homeostasis de calcio descrita previamente por Pla-Martín *et al.* (2013).

El 2,5-di-(ter-butil)-1,4-benzohidroquinona (tBuBHQ) es un inhibidor de la bomba SERCA, la ATPasa de Ca^{2+} del RE, causando el vaciado de calcio del RE, y por tanto, un aumento en los niveles citosólicos de calcio. El vaciado de este almacén intracelular activa la entrada de Ca^{2+} a través de canales de baja conducción en la membrana plasmática. Estos canales están regulados por el mecanismo de entrada de Ca^{2+} inducido por el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} , mecanismo conocido como SOCE (Hoth *et al.*, 1997).

Tras inhibir la bomba SERCA al tratar las células con tBuBHQ 100 μM medimos los niveles de Ca^{2+} en medio libre de Ca^{2+} . Al aplicar esta droga, observamos un aumento en los niveles de calcio citosólicos seguido de un tamponamiento de los niveles con diferencias entre los clones. Mientras que los controles tamponaban el calcio de manera efectiva, la curva de tamponamiento era diferente en el caso de los clones deficientes en GDAP1 y en el clon FXN-138.1. De nuevo, estas células deficientes exhibían un pico de calcio citosólico menor que el de los controles, y prácticamente no conseguían disminuir estos niveles de calcio citosólicos. En el caso del clon FXN-138.2, los niveles de calcio citosólicos no paraban de aumentar tras la adición del tBuBHQ (**Figura 39B**). Por tanto, a diferencia de las células control, las células deficientes en frataxina y en GDAP1 presentaban defectos en el tamponamiento de calcio tras un aumento en su concentración citosólica.

Tras el vaciado de Ca^{2+} del RE, añadimos Ca^{2+} 2 mM al medio extracelular para inducir el mecanismo de SOCE. La inducción del SOCE en las células deficientes en frataxina estaba reducido comparado con el comportamiento de los controles (**Figura 39B, panel superior derecho**), al igual que pasaba en los clones deficientes en GDAP1, confirmando de nuevo lo observado por Pla-Martín *et al.* (2013).

Todos estos resultados nos sugerían que el déficit de frataxina y de GDAP1 afectaban la homeostasis de calcio. Los defectos observados en el tamponamiento de altos niveles citosólicos de calcio tras el tratamiento con veratridina podían ser debidos a defectos en el tamponamiento tanto del RE como de la mitocondria en estas células. Sin embargo, los defectos observados en el tamponamiento de altos niveles citosólicos de calcio tras el tratamiento con tBuBHQ nos sugerían que el fallo residía en la mitocondria.

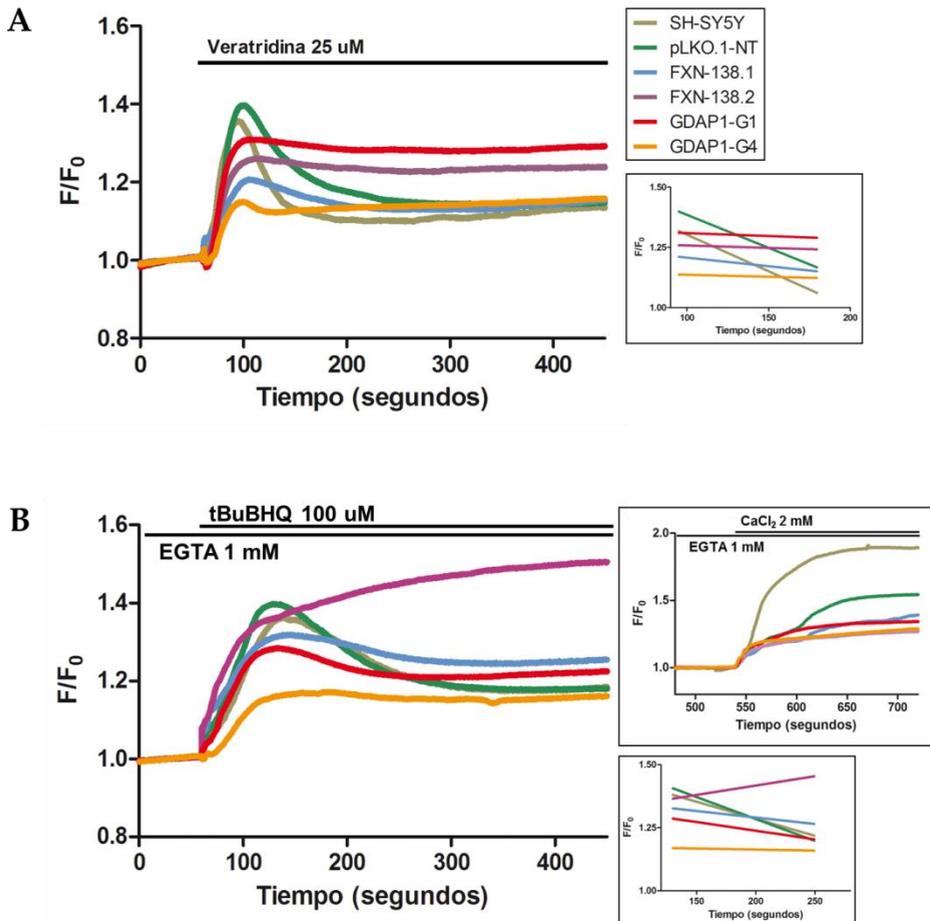


Figura 39. Homeostasis de calcio en las células SH-SY5Y. **A)** Cambios en la intensidad de fluorescencia de la sonda *Fura-2 AM* que reflejan las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{citosol}}$ tras la adición de veratridina 25 μM . Las pendientes de recuperación para cada clon tras la entrada de calcio extracelular (panel inferior derecho) muestran el diferente comportamiento en el tamponamiento de calcio entre las células control y las células deficientes en frataxina y en GDAP1. **B)** Cambios en la intensidad de fluorescencia de la sonda *Fura-2 AM* que reflejan las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{citosol}}$ tras la adición de tBuBHQ 100 μM en medio libre de Ca^{2+} . Las pendientes de recuperación tras la salida de calcio del RE (panel inferior derecho) muestran el distinto comportamiento en el tamponamiento de calcio entre las células control y las células deficientes en GDAP1 y en frataxina, sobre todo para el clon FXN-138.2. La activación del SOCE con la adición de Ca^{2+} 2 mM a las células tratadas con tBuBHQ muestra la alteración en las células deficientes en frataxina y en GDAP1, con una menor activación del SOCE comparado con los controles (panel superior derecho).

13. El déficit de frataxina afecta la capacidad mitocondrial de captación de calcio.

Como se describió en el trabajo de Pla-Martín *et al.* (2013), el déficit de GDAP1 disminuía el mecanismo de entrada de calcio activado por el vaciado de los depósitos intracelulares de calcio en las células SH-SY5Y. Esta alteración en el SOCE no se debía a defectos en la captación de calcio por parte del RE o de las mitocondrias de las células deficientes en GDAP1, sino que se debía a la comunicación alterada entre el RE y las mitocondrias deficientes en GDAP1 (Pla-Martín *et al.*, 2013). Quisimos ver si por el contrario en las células deficientes en frataxina el tamponamiento anormal de calcio observado se debía a una disfunción en la capacidad tamponadora de calcio por parte de las mitocondrias. Con el fin de responder a esto realizamos experimentos para evaluar la capacidad de captación de calcio mitocondrial en células permeabilizadas con digitonina en presencia de la sonda *Calcium Green 5N*. Esta sonda es capaz de emitir fluorescencia al unir calcio libre presente en la solución. Añadiendo pulsos de CaCl_2 4 mM a la solución con las células permeabilizadas podíamos registrar picos de fluorescencia debidos a la unión de la sonda *Calcium Green 5N* al calcio, seguidos de una disminución en los valores de fluorescencia a medida que las mitocondrias presentes en la solución captaban el calcio. La adición de CaCl_2 se repite hasta que la fluorescencia no disminuye, lo que indica la sobrecarga de calcio en las mitocondrias y la rotura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP). Mientras que en las células control y en los clones deficientes en GDAP1 las mitocondrias eran capaces de captar calcio, en las células deficientes en frataxina observamos ya desde el primer pulso de calcio la incapacidad mitocondrial de captarlo, lo que nos confirmó un fuerte defecto en el tamponamiento mitocondrial de calcio debido a un déficit en la proteína frataxina (**Figura 40A-C**).

Estos resultados nos sugerían que un exceso en la concentración local de calcio citosólica en las células deficientes en frataxina, causado por la incapacidad de sus mitocondrias de captar calcio, induciría una regulación negativa en el mecanismo de SOCE. La entrada de calcio en la mitocondria durante el mecanismo de SOCE activa el metabolismo mitocondrial, provocando una hiperpolarización de la mitocondria que hace más eficaz el proceso de SOCE. A su vez, la captación mitocondrial de calcio activa los canales de entrada de calcio en la membrana

plasmática, de forma que entra más calcio para rellenar los depósitos intracelulares. En el caso de las células deficientes en frataxina, la despolarización observada en sus mitocondrias impediría la captación mitocondrial de calcio. Al no captar calcio estas mitocondrias tras la activación del SOCE, no se regularía positivamente la activación de los canales de entrada de calcio en la membrana plasmática, por lo que el mecanismo de SOCE sería menos eficaz en las células deficientes en frataxina.

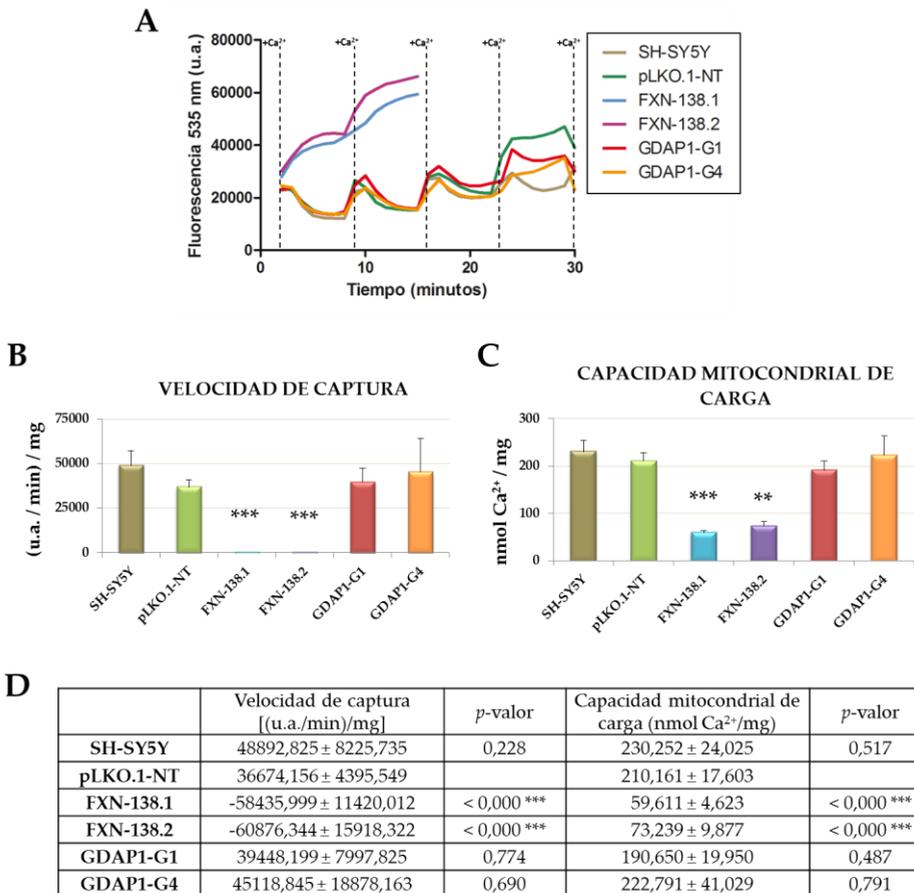


Figura 40. El déficit de frataxina afecta a la capacidad mitocondrial de captación de calcio. A) Cambios en la fluorescencia de *Calcium Green 5N* tras la adición de pulsos de 4 nmoles de Ca²⁺ en presencia de células permeabilizadas con digitonina. A partir de las pendientes de las curvas del gráfico A se calcularon la velocidad de captación de Ca²⁺ (B) y la capacidad mitocondrial de carga (C) para cada uno de los clones SH-SY5Y. Los resultados muestran la incapacidad mitocondrial de captación de calcio en las células deficientes en frataxina, en

Resultados

contraste con la normal capacidad de las células control y las deficientes en GDAP1 en captar calcio por parte de sus mitocondrias. **D)** Valores promedio \pm SEM de la velocidad de captación de calcio y de la capacidad mitocondrial de carga para cada uno de los clones. Significatividad ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ respecto al control pLKO.1-NT.

DISCUSIÓN

“Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión.”

José Ortega y Gasset.

Las distintas funciones que realiza la mitocondria hacen que sea un orgánulo esencial en la célula, y de especial importancia en el sistema nervioso. La disfunción mitocondrial tiene consecuencias graves en la fisiología celular, ya que el daño mitocondrial puede causar la activación de la muerte celular programada a través de distintas vías de actuación. Cada vez hay más evidencias del papel de la mitocondria en la patogénesis del proceso neurodegenerativo.

Nuestro interés en este trabajo ha sido investigar los mecanismos patogénicos relacionados con la degeneración neuronal de diferentes, pero relacionadas, neuropatías periféricas hereditarias: ataxia de Friedreich (FRDA) y Charcot-Marie-Tooth (CMT) tipo 4A/2K. Ambas enfermedades son neurodegenerativas y muestran una neuropatía axonal periférica como su mayor característica. Y las dos enfermedades están causadas por el déficit de una proteína mitocondrial: frataxina en el caso de FRDA y GDAP1 en CMT4A/2K. Sin embargo, hay varios puntos que las hacen diferentes:

i) Sus células diana no son idénticas. En FRDA están afectados los nervios sensitivos y las neuronas sensitivas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y en CMT4A/2K están afectadas las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal y las neuronas sensitivas del DRG.

ii) En FRDA se produce degeneración de las columnas posteriores, los tractos espinocerebelares, la columna de Clarke y el cerebelo, mientras que en CMT4A/2K no están afectadas las vías centrales.

iii) Los compartimentos mitocondriales de las proteínas deficitarias son distintos. Frataxina se localiza en la matriz mitocondrial mientras que GDAP1 está en la membrana mitocondrial externa.

La investigación de estos trastornos mendelianos raros nos puede ayudar a comprender los mecanismos subyacentes de la enfermedad y el papel de la mitocondria en la patología celular. De hecho, la disfunción mitocondrial ha surgido como un potencial denominador común en diversos trastornos neurodegenerativos (Bowling & Beal, 1995; Tatsuta & Langer, 2008; Nunnari & Suomalainen, 2012). En este trabajo hemos querido investigar cómo tanto la reducción de frataxina como la de GDAP1 afectan aspectos de la fisiología mitocondrial asociados a la neurodegeneración como son la dinámica mitocondrial, la comunicación de la mitocondria con otros orgánulos, la homeostasis de calcio o la apoptosis. El estudio de estos procesos en el contexto del déficit de

frataxina o de GDAP1 es importante para entender su impacto en la fisiología celular. Pero también nos puede ayudar a comprender por qué determinadas células del sistema nervioso en FRDA y CMT4A/2K y en otros tejidos afectados en el caso de FRDA son más susceptibles a la disminución en los niveles de frataxina y de GDAP1 respectivamente.

Con el fin de estudiar el efecto de la carencia de frataxina y de GDAP1 sobre la homeostasis celular, desarrollamos sendos modelos celulares de déficit de estas proteínas por silenciamiento génico de sus respectivos genes, *FXN* y *GDAP1*, en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. La principal ventaja de este modelo es que las células de neuroblastoma derivan de la cresta neural, al igual que las neuronas del DRG afectadas en las neuropatías FRDA y CMT4A/2K. Este origen común hace que las líneas de neuroblastoma sean buenos candidatos como modelos celulares para el estudio de enfermedades relacionadas con el DRG y otras células derivadas de la cresta neural. Tanto los clones celulares obtenidos deficitarios en frataxina, FXN-138.1 y FXN-138.2, como los deficitarios en GDAP1, GDAP1-G1 y GDAP1-G4, mantenían a lo largo del tiempo una reducción en las respectivas proteínas, emulando el déficit crónico que se da en la enfermedad humana.

1. Fisiopatología celular asociada al déficit de frataxina y al déficit de GDAP1.

1.1. El déficit de frataxina causa un retraso en el crecimiento celular asociado a senescencia, mientras que el déficit de GDAP1 no afecta a la proliferación celular.

En estudios previos en otros modelos de déficit de frataxina en células murinas y humanas se ha observado un crecimiento celular enlentecido en estas células (Ristow *et al.*, 2003; Zanella *et al.*, 2008; Calmels *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009). En el modelo de déficit de frataxina en células de neuroblastoma humano que presentamos en este trabajo también hemos observado un crecimiento celular enlentecido.

En algunos de estos trabajos previos, la disminución en el crecimiento celular observada en células deficitarias en frataxina está asociada a un aumento en la apoptosis de dichas células. Por ejemplo, Ristow y colaboradores (2003) observaron una reducción en el número de células

β del páncreas en un modelo de ratón con delección del gen *Frda* específicamente en estas células. La reducción en el número de células se debía conjuntamente a un aumento en la apoptosis y a una disminución en la capacidad proliferativa en estas células deficientes en frataxina.

Lu y colaboradores (2009) silenciaron *FXN* en varias líneas neuronales humanas y murinas. Solo observaron disminución en la proliferación celular en células humanas con déficit de frataxina: en células de Schwann, oligodendrocitos y neuronas. Estas células presentaban una detención en la fase G1 del ciclo celular, al igual que observamos en nuestro modelo de déficit de frataxina. Sin embargo, en el trabajo de Lu *et al.* (2009), en las células de Schwann deficitarias en frataxina la disminución en la proliferación celular se debía además a una reducción en la viabilidad celular y desencadenaba un aumento en la apoptosis. Por el contrario, en nuestro modelo de déficit crónico de frataxina, esta reducción en la proliferación celular no afecta a la viabilidad celular ni está asociada a la muerte celular por apoptosis.

Como vemos, no siempre la reducción en el crecimiento celular causada por el déficit de frataxina está asociada a un aumento en la apoptosis. En los trabajos de Zanella *et al.* (2008) y de Calmens *et al.* (2009) se observó que el déficit de frataxina causaba una reducción en el crecimiento de células HeLa y de varias líneas celulares de fibroblastos murinos, respectivamente. En ambos trabajos, el crecimiento celular disminuido no estaba asociado a un aumento en la apoptosis de las células deficitarias en frataxina, al igual que ocurre en nuestro modelo.

Continuando con el efecto del déficit de frataxina sobre la apoptosis, la disminución transitoria de frataxina en células de DRG de rata y en células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas a fenotipo neuronal causaba un aumento en la apoptosis (Palomo *et al.*, 2011; Mincheva-Tasheva *et al.*, 2013). Curiosamente, en el trabajo de Palomo *et al.* (2011) se observó una menor apoptosis cuando las células con silenciamiento de *FXN* no estaban diferenciadas, por comparación con nuestro modelo celular, donde no observamos apoptosis en células SH-SY5Y no diferenciadas. Sin embargo, al diferenciar las células a fenotipo neuronal tampoco observamos apoptosis en nuestro modelo (dato no mostrado). A diferencia de lo que ocurre en estos modelos de déficit de frataxina, considerados un modelo transitorio de “déficit agudo de frataxina”, en nuestro modelo la disminución de frataxina es continua, considerándose un modelo de “déficit crónico de frataxina”, lo que puede contribuir a las

diferencias observadas entre el incremento de apoptosis en estos modelos y ausencia de apoptosis en el nuestro. Probablemente, el déficit sostenido de frataxina debe favorecer la adaptación celular, promoviendo mecanismos moleculares que previenen la muerte celular, como la autofagia, proceso que encontramos incrementado en nuestro modelo de déficit crónico de frataxina.

Por otra parte, en el trabajo de Mincheva-Tasheva *et al.* (2013), cuando sobreexpresaban tanto la proteína Bcl-x_L como el dominio BH4 de esta proteína en células de DRG de rata con silenciamiento transitorio de *Fxn*, recuperaban la viabilidad celular al disminuir la apoptosis en estas células deficitarias en frataxina. En nuestro caso, en concreto en el clon con mayor disminución de frataxina, FXN-138.1, observamos un aumento en los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. La proteína Bcl-2 comparte con la proteína Bcl-x_L el dominio BH4, que es el responsable de las propiedades anti-apoptóticas de estas proteínas. Por esto, el aumento en los niveles de la proteína Bcl-2 en el clon FXN-138.1 podría contribuir a la ausencia de muerte celular observada en estas células. Quedaría analizar los niveles de otras proteínas de la familia Bcl-2 que contienen el dominio BH4, como Bcl-x_L o Bcl-w, en el clon FXN-138.2 para determinar si estas proteínas están aumentadas en estas células, lo que podría contribuir a explicar la ausencia de apoptosis observada en el clon FXN-138.2.

Todos estos resultados muestran que la sensibilidad al déficit de frataxina es diferente según el tipo celular y que la afectación celular depende de los niveles de disminución de frataxina y de la continuidad en el tiempo de su disminución, como ocurre en la enfermedad. Nuestro modelo de silenciamiento de *FXN* en células de neuroblastoma humano tiene la ventaja de compartir un origen común con las células de DRG afectadas en los pacientes FRDA y se trata de un modelo “crónico” de déficit de frataxina, al igual que ocurre en estos pacientes. Por esto, nuestros resultados nos proporcionan una valiosa información sobre lo que podría ocurrir en las células afectadas principalmente en ataxia de Friedreich.

El retraso en el crecimiento de las células deficientes en frataxina está asociado a la senescencia celular, ya que observamos un aumento en la población de células positivas para la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia, células detenidas en la fase G1 del

ciclo celular, y cambios morfológicos asociados a la senescencia celular, como un fenotipo alargado y mayor adhesión celular.

Observamos además en estas células un incremento en la elongación mitocondrial y, curiosamente, los cambios morfodinámicos de las mitocondrias están íntimamente relacionados con el ciclo celular y concretamente la elongación mitocondrial puede desencadenar senescencia celular (Lee *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2014). En los trabajos de Lee y colaboradores se observó que el déficit de la proteína de fisión mitocondrial Fis1 inducía en células HeLa una elongación mitocondrial y cambios fenotípicos asociados a senescencia, como alargamiento celular, aspecto granular del citoplasma celular, aumento de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia y disminución en el crecimiento celular por defectos en la progresión de la fase G2/M del ciclo celular. El déficit prolongado de Fis1 en estas células causaba la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño en el ADN, que, junto con la fusión mitocondrial por desequilibrio de la fisión mitocondrial, contribuían a los cambios fenotípicos asociados a la senescencia en estas células. La senescencia celular puede actuar como un mecanismo protector frente al estrés oxidativo. Por ejemplo, Mai y colaboradores observaron que ante un estrés oxidativo, la elongación mitocondrial en células endoteliales humanas senescentes protegía de la apoptosis celular (Mai *et al.*, 2010).

Basado en el fenotipo de nuestro modelo celular de déficit de frataxina, sugerimos que estas células han adquirido un fenotipo senescente que las protege de la muerte celular ante la disfunción celular causada por la falta de frataxina. En concreto estas células presentan una alteración de la bioenergética mitocondrial, un elevado estrés oxidativo que repercute además en un estrés de retículo endoplasmático, y una alteración en la homeostasis del calcio. La senescencia celular no ha sido descrita previamente en pacientes FRDA o en modelos de la enfermedad. Nuestros resultados sugieren que la senescencia celular puede contribuir a la fisiopatología de la enfermedad FRDA. La senescencia celular implica una pérdida de función, y por tanto la aparición de un fenotipo relacionado con la edad o con el envejecimiento prematuro. Recientemente se ha asignado a la senescencia celular un papel directo en el desarrollo embrionario (Munoz-Espin *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013). En un estudio reciente de necropsias de pacientes FRDA, Koeppen &

Mazurkiewicz han sugerido que la neuropatía FRDA debe ser interpretada como una combinación de retraso en el desarrollo y degeneración (Koeppen & Mazurkiewicz, 2013). Estos autores observaron que las principales lesiones del SNC implican el núcleo dentado del cerebelo, las células de Betz (neuronas piramidales localizadas en la corteza cerebral, cuyos axones se extienden hasta la médula espinal estableciendo sinapsis con las neuronas motoras de las astas anteriores), y los tractos corticoespinales, presentando atrofia y degeneración. Esto contrastaba con el DRG, que sufre hipoplasia y atrofia añadida, es decir, un desarrollo incompleto y disminución de tamaño. Nosotros proponemos que, mientras que la muerte celular por apoptosis debe estar asociada a la neurodegeneración, el fenotipo senescente que observamos en las células deficitarias en frataxina debe ser un fenómeno asociado a un retraso en el desarrollo, de forma que la pérdida de funcionalidad celular afectaría al programa de neurogénesis y alteraría el desarrollo adecuado del SNP, apoyando la hipótesis propuesta por Koeppen & Mazurkiewicz por la que el DRG en la patología FRDA estaría sujeto a un desarrollo incompleto y a una hipotrofia añadida.

Al contrario de lo que ocurre ante el déficit de frataxina, las células deficitarias en GDAP1 no presentan alteraciones en la proliferación celular. Sin embargo, observamos un aumento en la población de células positivas para la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia en las células con menores niveles de proteína GDAP1. Como hemos comentado anteriormente, sería necesario analizar la presencia de otros marcadores de senescencia celular en estas células para confirmar si la reducción en GDAP1 induce la entrada en senescencia, ya que no observamos en estas células una detención en la fase G1 del ciclo celular o un fenotipo celular alargado, como observamos en las células deficitarias en frataxina. Sin embargo, las células deficitarias en GDAP1 también presentan una serie de características que comprometen su viabilidad, como son: un incremento en el estrés oxidativo, alteraciones en la morfología mitocondrial, alteración de la homeostasis de calcio y susceptibilidad a estrés de retículo endoplasmático. Todas estas características podrían inducir la entrada en senescencia celular ante un déficit en GDAP1.

Al igual que ocurre ante el déficit de frataxina, no observamos muerte celular programada en condiciones basales en las células deficitarias en

GDAP1. Sin embargo, el cociente entre las proteínas Bcl-2 y Bax está disminuido en estas células, debido a una disminución en los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y a un aumento en los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax. Un cociente disminuido entre las proteínas Bcl-2/Bax se asocia a una disminución en la supervivencia celular, por lo que las células deficitarias en GDAP1 podrían ser más susceptibles a un estímulo de daño celular.

1.2. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 causan un aumento en el estrés oxidativo celular.

La reducción crónica de frataxina en las células SH-SY5Y afecta a la función mitocondrial causando una disminución en la actividad del complejo IV de la cadena de transporte de electrones, un déficit de energía en forma de ATP, una disminución en el consumo de oxígeno y una despolarización de la membrana mitocondrial interna. Todo esto confirma que el déficit de frataxina causa una disfunción de la respiración mitocondrial.

Nuestros resultados de alteración en la cadena de transporte de electrones mitocondrial coinciden con trabajos previos en modelos de déficit de frataxina o en muestras de pacientes FRDA en los que se ha observado un defecto en dicha actividad. Sin embargo, existe controversia en cuanto a qué complejos están alterados en células deficitarias en frataxina. Por ejemplo, en modelos de déficit de frataxina en levadura se ha observado afectación de los complejos I+III, II, IV y V (Foury & Cazzalini, 1997; Rotig *et al.*, 1997; Muhlenhoff *et al.*, 2002; Gonzalez-Cabo *et al.*, 2005). En modelos murinos de déficit de frataxina también se ha visto afectación en los complejos I, II y III en tejido cardíaco, aunque la reducción de la actividad no siempre es significativa (Al-Mahdawi *et al.*, 2006).

En cuanto a estudios en tejidos de pacientes FRDA, no todos los tejidos se ven afectados de la misma manera. En los trabajos de Rotig *et al.* y de Bradley *et al.* se observó un déficit en la actividad de los complejos I, II y III en biopsias de corazón de pacientes FRDA, mientras que en otros tejidos, incluidos tejidos nerviosos no se observó alteración en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Rotig *et al.*, 1997; Bradley *et al.*, 2000).

También se han realizado estudios en modelos celulares a partir de muestras de pacientes FRDA, mostrando de nuevo una diversidad en

cuanto a la afectación de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Por ejemplo, en linfoblastos derivados de pacientes FRDA se observó afectación en la actividad de los complejos II, III y IV (Schoenfeld *et al.*, 2005). Sin embargo, en neuronas y miocardiocitos derivados de células madre pluripotentes de pacientes FRDA no había afectación en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Hick *et al.*, 2013).

Es importante tener en cuenta el tipo celular para el estudio de la respuesta de la célula ante el déficit de frataxina, pues queda patente que no todos los tipos celulares se ven afectados de la misma manera. Los modelos de déficit de frataxina en células del sistema nervioso proporcionan una valiosa información acerca de la posible función de frataxina en estas células, cuestionando la principal función de frataxina en la biosíntesis de centros de Fe/S (ISC), ya que no siempre se ven alterados los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial que contienen ISC, los complejos I, II y III (Napoli *et al.*, 2007; Carletti *et al.*, 2014).

La disminución en la actividad del complejo IV observada en nuestro modelo de déficit de frataxina correlaciona con una menor expresión de las subunidades COXI y COXII de dicho complejo. El complejo IV o citocromo *c* oxidasa (COX) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial es un enzima multimérico que cataliza el último paso de la respiración mitocondrial: la transferencia de electrones desde el citocromo *c* hasta el oxígeno molecular. El complejo humano está formado por 13 subunidades de las cuales COXI, II y III, codificadas por el genoma mitocondrial, constituyen el centro catalítico del enzima. Las subunidades COXI y II contienen cobre (Cu) y el grupo hemo *a* como grupos prostéticos. El resto de subunidades, codificadas por el genoma nuclear, rodean el núcleo del enzima y son necesarios para su ensamblaje, estabilidad y dimerización, además de protegerlo de las especies reactivas del oxígeno (ROS). La biogénesis del centro catalítico de COX es un proceso altamente regulado durante la síntesis de sus subunidades, la inserción en la membrana mitocondrial interna, la maduración y el ensamblaje del centro catalítico (Fontanesi *et al.*, 2008). Su ensamblaje y estabilidad depende de otros factores, como la funcionalidad de la ATPasa (Soto *et al.*, 2009) y de la síntesis e inserción del grupo hemo (Kim *et al.*, 2012).

Frataxina tiene un papel en el metabolismo mitocondrial de hierro, tanto en la biosíntesis de ISC como en la biosíntesis de grupos hemo, actuando como donador de hierro en ambas rutas (Muhlenhoff *et al.*, 2002; Gerber *et al.*, 2003; Lesuisse *et al.*, 2003; Yoon & Cowan, 2003; 2004; Shan *et al.*, 2007). Varios modelos de déficit de frataxina muestran una desregulación de la biosíntesis de grupos hemo. En el trabajo de Schoenfeld *et al.* (2005), donde combinaron resultados de *microarrays* de linfocitos de pacientes FRDA y de miocardiocitos y hepatocitos de ratones *knockout* de *Frda* específicos de tejido, observaron una menor expresión de las proteínas ferroquelatasa y coproporfirinógeno oxidasa mitocondrial, CPOX. Estas proteínas son necesarias para la síntesis del grupo hemo *a*, cuyos niveles también estaban disminuidos en los linfocitos FRDA. Observaron además una reducción en los niveles de MTCP1, homólogo funcional de las subunidades Cox23p y Cox17p de levadura que actúan como metalochaperonas para la aportación de Cu al complejo COX. El déficit de hemo *a*, un cofactor esencial del complejo COX, y la disminución de MTCP1, necesaria para el ensamblaje del complejo correlacionaba con una disminución en la actividad del complejo IV en linfocitos FRDA (Schoenfeld *et al.*, 2005). En un trabajo posterior, Napoli *et al.* (2007) observaron en células de oligodendroglioma humano con silenciamiento de frataxina una disminución de la actividad de la enzima adrenodoxina, que contiene ISC y participa en la ruta de biosíntesis de grupos hemo, y del complejo IV debido a una disminución en los niveles del grupo hemo *a* (Napoli *et al.*, 2007). No es sorprendente, por tanto, que si frataxina está implicada en la ruta biosintética de grupos hemo, la disminución en los niveles de frataxina repercute en la actividad del complejo IV, cuyas subunidades catalíticas COXI y COXII requieren al grupo hemo como cofactor.

La disfunción en la cadena de transporte de electrones mitocondrial repercute en la fosforilación oxidativa, como observamos en nuestro modelo de silenciamiento de *FXN*, al igual que se ha visto en otros trabajos con muestras de pacientes FRDA (Lodi *et al.*, 1999; Bradley *et al.*, 2000; Garcia-Gimenez *et al.*, 2011). Esta disminución en la producción de ATP correlaciona con el menor consumo de oxígeno que tienen nuestras células deficitarias en frataxina. Todos estos resultados concuerdan con la afectación observada en el potencial transmembrana mitocondrial, $\Delta\psi_m$, que es un indicador del estado de la función mitocondrial (Duchen, 1999; Perry *et al.*, 2011).

La cadena de transporte de electrones mitocondrial es una fuente productora de especies reactivas del oxígeno (ROS), ya que durante la transferencia de electrones, éstos pueden reaccionar directamente con el oxígeno o con otros aceptores de electrones generando radicales libres. Así, una disminución en la eficacia de la cadena de transporte de electrones puede incrementar la producción de ROS, como parece ocurrir en nuestro modelo celular de déficit de frataxina. El incremento del O₂ y de proteínas carboniladas observado concuerda con trabajos previos en varios modelos de déficit de frataxina incluyendo levadura (Babcock *et al.*, 1997; Foury & Cazzalini, 1997; Cavadini *et al.*, 2000b), *Drosophila* (Anderson *et al.*, 2005; Llorens *et al.*, 2007), *Caenorhabditis elegans* (Vazquez-Manrique *et al.*, 2006; Zarse *et al.*, 2007), ratón (Ristow *et al.*, 2003; Thierbach *et al.*, 2005; Al-Mahdawi *et al.*, 2006) y en muestras de pacientes FRDA (Wong *et al.*, 1999; Sparaco *et al.*, 2009; Bulteau *et al.*, 2012) en los que también se ha observado un aumento de estrés oxidativo. De hecho, el incremento en el estrés oxidativo celular es la única característica que comparten todos los modelos de déficit en frataxina. Nuestros resultados confirman el papel del estrés oxidativo en la patogénesis FRDA.

Las células deficitarias en GDAP1 también presentan un aumento en los niveles de O₂ y de proteínas carboniladas, lo que sugiere que el déficit de GDAP1 causa un estrés oxidativo celular. Sin embargo, estas células no presentan una alteración en la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, por lo que no podemos asignar un origen mitocondrial de dicho estrés oxidativo.

Otros autores sin embargo sí que observaron en fibroblastos de pacientes de CMT2K una disminución en la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Pero la tasa de producción de ATP por consumo de oxígeno era normal en estos fibroblastos, lo que indicaba que la eficacia de la fosforilación oxidativa no estaba alterada (Cassereau *et al.*, 2009).

Existen algunos trabajos en los que relacionan GDAP1 con el estrés oxidativo. En un trabajo sobre cómo el modo de herencia de las mutaciones en *GDAP1* difieren sobre sus efectos en la dinámica mitocondrial y en la apoptosis celular en diferentes líneas celulares, sus autores observaron que las mutaciones dominantes en *GDAP1* R120W, T157P y Q218E causaban un déficit parcial en el $\Delta\psi_m$ en células HeLa.

Además, las mutaciones R120W y T157P causaban un aumento en la producción de ROS y mayor susceptibilidad a la apoptosis celular en estas células (Niemann *et al.*, 2009). Sin embargo, el silenciamiento de *GDAP1* en la línea celular HeLa no afectaba al $\Delta\psi_m$, ni causaba un incremento en la producción de ROS. Tampoco el déficit de *GDAP1* causaba muerte celular ante un estímulo apoptótico en células HeLa ni en la línea de neuroblastoma de ratón Neuro2a. En nuestro modelo de déficit de *GDAP1* en neuroblastoma humano tampoco observamos apoptosis a pesar de que las células tienen un incremento en el estrés oxidativo celular. Sin embargo, nuestras células tienen aumentada la autofagia basal como un mecanismo protector frente a dicho estrés oxidativo. Como hemos comentado, estas células sufren apoptosis cuando se les induce un estrés de retículo endoplasmático (RE) y se les bloquea la autofagia (Pla Martín, 2012). No podemos descartar que en el modelo de déficit de *GDAP1* en neuroblastoma de ratón de Niemann *et al.* (2009), las células no sufrieran muerte celular programada al tratarlas con los agentes pro-apoptóticos estaurosporina o actinomicina D porque activaban otros procesos celulares citoprotectores, como la autofagia, al igual que en nuestro modelo neuronal de déficit de *GDAP1*.

Recientemente se ha visto en un modelo de ratón *knockout* de *Gdap1* un aumento en la biogénesis mitocondrial por incremento en los niveles de *Pgc1 α* como marcador de dicha biogénesis (Niemann *et al.*, 2014). Dado que un aumento en la biogénesis mitocondrial está relacionado con un estrés oxidativo persistente, los autores asociaron este incremento en la sobreexpresión de *Pgc1 α* a un ligero aumento en los niveles de estrés oxidativo celular, ya que además observaron un incremento, aunque no significativo, en los niveles de *Sod2*. Estos resultados únicamente los observaron en tejido de sistema nervioso periférico (SNP), pero no en tejidos de sistema nervioso central (SNC). La explicación de por qué no observaban esto en el SNC es que en estos tejidos se expresa *Gdap1l1*, el parálogo de *Gdap1*, mientras que en SNP no se expresa. Los autores observaron que en condiciones de estrés oxidativo, *GDAP1L1* se traslocaba desde el citosol a la membrana mitocondrial externa, donde compensaría el déficit de *GDAP1* en estos tejidos. Nuestro modelo neuronal de silenciamiento de *GDAP1*, al contrario de lo que ocurre en este modelo murino, sí que tiene un incremento significativo en el estrés oxidativo celular. El nuestro es un modelo de SNP, donde *GDAP1L1* no se expresaría y por tanto no podría compensar el déficit de *GDAP1*.

En un trabajo de Noack y colaboradores observaron que la sobreexpresión de *Gdap1* en la línea HT22 (línea neuronal de hipocampo de ratón) proporcionaba a las células mayor resistencia a muerte celular inducida por estrés oxidativo (Noack *et al.*, 2012). En concreto, en este trabajo seleccionaron las células HT22 resistentes a muerte celular por altas concentraciones de glutamato. Elevados niveles de glutamato extracelular causan el bloqueo del gradiente generado por el sistema antiportador glutamato/cistina, lo que disminuye los niveles intracelulares de cistina, la forma reducida de cisteína. La cisteína es necesaria para la síntesis de glutatión, GSH, por lo que la disminución de cisteína causaba en estas células un déficit de GSH, promoviendo un elevado estrés oxidativo y la muerte celular. Noack y colaboradores seleccionaron las células HT22 resistentes a la apoptosis por estrés oxidativo y analizaron qué genes estaban sobreexpresados en estas células. Observaron un incremento en la expresión de *Gdap1*, pero también, aunque en menor grado, de *Gdap111*. Estas células presentaban un aumento en el $\Delta\psi_m$ y una disminución en los niveles de ROS, que los autores atribuyeron a la sobreexpresión de GDAP1. De hecho, al sobreexpresar *GDAP1* en esta misma línea neuronal, observaron una disminución en la apoptosis inducida por altos niveles de glutamato, y al silenciar *GDAP1* observaron el efecto contrario, es decir, un aumento en la apoptosis inducida por estrés oxidativo. Sin embargo, cuando sobreexpresaron *GDAP1* en la línea neuronal NSC34 (línea híbrida de neuroblastoma y motoneuronas de ratón), el incremento de GDAP1 no confería resistencia frente a la disminución en los niveles de GSH. Y al silenciar *GDAP1* en las mismas células observaron distinta susceptibilidad a la apoptosis dependiendo del estímulo. Por ejemplo, el déficit en GDAP1 no aumentaba la apoptosis ante un estrés oxidativo por H₂O₂ o ante un estrés de RE por tunicamicina, pero sí aumentaba la apoptosis al disminuir los niveles de GSH. La línea NSC34 es un modelo neuronal de SNP, mientras que la línea HT22 es un modelo neuronal de SNC. La diferente respuesta de ambos tipos celulares ante las variaciones en GDAP1 debe residir en el efecto de GDAP1L1, que se expresa exclusivamente en SNC. Por tanto, la ausencia de GDAP1L1 en la línea NSC34 no contrarrestaría el déficit de GDAP1 en estas células, que serían más susceptibles a un estrés oxidativo por disminución de GSH. Como hemos comentado antes, nuestro modelo de silenciamiento de *GDAP1* se trata de un modelo neuronal del SNP, donde GDAP1L1 no se expresa, y

podríamos compararlo con el modelo de silenciamiento de *GDAP1* en la línea NSC34. Pero, a diferencia de lo que ocurre en la línea NSC34 con déficit en *GDAP1*, donde aumenta la apoptosis ante un estrés oxidativo, en nuestro modelo celular, el estrés oxidativo causado por el déficit de *GDAP1* no induce la apoptosis. Nuestras células presentan un incremento en la autofagia como mecanismo citoprotector. Sin embargo, cuando la autofagia se bloquea, las células deficitarias en *GDAP1* son más susceptibles a muerte celular ante un estímulo apoptótico. En concreto, en nuestro laboratorio tampoco se observó aumento de apoptosis al causar un estrés de RE con tunicamicina en las células deficitarias en *GDAP1*, pero sí al tratarlas con tunicamicina y bafilomicina A1, bloqueando así el flujo autofágico (Pla Martín, 2012).

1.3. El déficit de frataxina y el déficit de *GDAP1* causan alteraciones en la morfología mitocondrial.

Las imágenes de microscopía electrónica del clon FXN-138.1 nos confirmaron una alteración mitocondrial ante el déficit de frataxina. En estas células observamos mitocondrias hinchadas, con desorganización de las crestas mitocondriales y con pérdida de densidad de la matriz mitocondrial, es decir, las mitocondrias tienen más espacios claros en su interior, al compararlas con las mitocondrias del control pLKO.1-NT, que tienen un tamaño menor, no están hinchadas y tienen un aspecto más oscuro en su interior. El hinchamiento mitocondrial, la menor densidad de la matriz mitocondrial y la desorganización de las crestas mitocondriales es indicativo de una disfunción mitocondrial y de presencia de estrés oxidativo (Mariappan *et al.*, 2007; Milei *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2013), lo que nos confirma que el déficit de frataxina provoca una disfunción mitocondrial causando un aumento en el estrés oxidativo celular.

En otros modelos de déficit de frataxina también se han descrito alteraciones en la estructura mitocondrial asociados a defectos en la función mitocondrial. Por ejemplo, en miocardiocitos de un ratón *knockout* de *Frda* específico de tejido muscular se observó un incremento en el número de mitocondrias por microscopía electrónica (Puccio *et al.*, 2001). La mayoría de estas mitocondrias tenían una desorganización de las crestas mitocondriales, lo que indicaba una disfunción mitocondrial y concordaba con defectos en la cadena de transporte de electrones mitocondrial observados en el tejido cardíaco de este ratón. Estos

resultados sugerían a los autores que en este tejido se producía un aumento en la proliferación mitocondrial como un mecanismo compensatorio frente al defecto funcional observado. También se observó por microscopía electrónica una acumulación mitocondrial y mayor presencia de mitocondrias con crestas desorganizadas en miocardiocitos derivados de células madre pluripotentes de pacientes FRDA (Hick *et al.*, 2013). En estos trabajos se sugiere un incremento en la proliferación mitocondrial ante una disfunción mitocondrial causada por el déficit en frataxina. En nuestro modelo neuronal de déficit de frataxina, también vemos cambios ultraestructurales en las mitocondrias disfuncionales, pero no observamos una proliferación mitocondrial. De hecho, el análisis por *Western Blot* de los niveles de las proteínas Pgc-1 α y mtTFA, implicadas en biogénesis mitocondrial, en extractos proteicos de nuestros clones con silenciamiento de *FXN* no reveló diferencias con respecto a los niveles de estas proteínas en las células control (dato no mostrado), descartando un incremento en la biogénesis mitocondrial en nuestro modelo neuronal de déficit de frataxina. Por el contrario, sí que observamos mediante inmunofluorescencia indirecta en nuestro modelo de células deficitarias en frataxina un aumento en el patrón mitocondrial tubular, lo que sugiere que estas células tienen una mayor actividad de fusión mitocondrial. Este incremento en la fusión mitocondrial lo hemos podido comprobar mediante microscopía electrónica de las células con mayor silenciamiento de *FXN*, el clon *FXN*-138.1, que presenta largas mitocondrias con un patrón tubular. En algunas de estas células observamos una especie de arborización que origina una red de grandes mitocondrias ramificadas. Nuevamente queremos recalcar la importancia del modelo de estudio del déficit de frataxina. Las diferencias observadas entre los modelos antes citados y el nuestro pueden residir en el tipo celular analizado. Mientras que en los anteriores trabajos se observa una proliferación mitocondrial en tejido cardíaco, nosotros observamos un aumento de fusión mitocondrial en un modelo neuronal de déficit crónico de frataxina. Quizá los distintos tipos celulares responden de diferente manera ante una disfunción mitocondrial, mediante un aumento en la proliferación mitocondrial o mediante un aumento en la fusión mitocondrial.

Con todos estos resultados consideramos que el incremento en la fusión mitocondrial observado en nuestro modelo de déficit de frataxina es una respuesta de estas células para tratar de contrarrestar los defectos

respiratorios y el estrés oxidativo causados por el déficit de frataxina. Existen trabajos en los que se muestra cómo la célula se adapta a diferentes condiciones mediante remodelaciones en su red mitocondrial. Por ejemplo, parece que existe una correlación entre la morfología de la red mitocondrial y la bioenergética, de forma que una disfunción de la cadena respiratoria puede alterar la morfología de la red mitocondrial y viceversa (Benard *et al.*, 2007; Nunnari & Suomalainen, 2012). De hecho se piensa que la fusión mitocondrial tiene una función protectora sobre la función mitocondrial, ya que permite la mezcla e intercambio de pequeñas moléculas, proteínas y ADNmt (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007). De esta forma la dinámica mitocondrial forma parte del sistema de control de calidad celular. La fusión mitocondrial permite la mezcla de componentes mitocondriales de forma que mitocondrias con una alteración en su funcionalidad se pueden mezclar con mitocondrias “saludables”, restableciéndose la función mitocondrial.

Por otra parte, también se ha relacionado la fusión mitocondrial con un papel anti-apoptótico, ya que la inhibición de la fusión mitocondrial favorece la muerte celular ante señales apoptóticas (Olichon *et al.*, 2003; Sugioka *et al.*, 2004). Estos datos concuerdan con nuestros resultados de ausencia de apoptosis en las células deficitarias en frataxina, que presentan una disfunción en la respiración mitocondrial y un aumento en la fusión mitocondrial como mecanismo compensatorio ante esta disfunción.

El papel de *GDAP1* se ha relacionado clásicamente con la dinámica mitocondrial. Se considera a *GDAP1* un factor de fisión mitocondrial dependiente de las proteínas de fisión Fis1 y Drp1, ya que la sobreexpresión de *GDAP1* en células HeLa en presencia de las proteínas Fis1 y Drp1 causaba un incremento en la fragmentación de la red mitocondrial, mientras que en ausencia de Fis1 y Drp1, la sobreexpresión de *GDAP1* no contrarrestaba el efecto de aumento en la fusión mitocondrial causado por el déficit de Fis1 y Drp1 (Niemann *et al.*, 2009). También la sobreexpresión de *GDAP1* en células Cos-7 causaba la fragmentación de la red mitocondrial (Niemann *et al.*, 2005; Pedrola *et al.*, 2008). Por otra parte, el silenciamiento de *GDAP1* en la línea de neuroblastoma de ratón N1E-115 causaba una disminución de la fragmentación mitocondrial (Niemann *et al.*, 2009).

Sin embargo, en nuestro modelo de déficit de *GDAP1* en neuroblastoma humano, así como en un trabajo previo (Pla-Martin *et al.*,

2013), observamos una disminución en el porcentaje de células con patrón tubular de la red mitocondrial y, curiosamente, un mayor porcentaje de células con un patrón de fragmentación mitocondrial. Además las células deficitarias en GDAP1 presentan un incremento en el número de mitocondrias, aunque de menor tamaño que las células control. Las diferencias observadas entre nuestros resultados y los trabajos antes citados residen probablemente en el tipo celular empleado. Las células Cos-7 y HeLa no expresan GDAP1, por lo que el efecto causado por su sobreexpresión en estas células nos proporciona información acerca de la posible función de GDAP1, pero no necesariamente causaría el mismo efecto en células donde sí que se expresa. Por otra parte, el diferente comportamiento observado al silenciar *GDAP1* en la línea de neuroblastoma de ratón N1E-115 y en nuestra línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y puede deberse al método de silenciamiento, ya que se trata de un silenciamiento transitorio en las células N1E-115 y un silenciamiento estable en las células SH-SY5Y.

Estos resultados nos indican que la función de GDAP1 no debe relacionarse exclusivamente con la fisión mitocondrial, sino con el mantenimiento de la red mitocondrial, que es un proceso altamente regulado según las demandas celulares, y en el que deben coordinarse ambos procesos de fusión y fisión mitocondriales.

1.4. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 causan un aumento en la autofagia basal.

La autofagia es un proceso celular que puede activarse por diversos factores como la privación nutricional, una alta demanda energética, cambios en el metabolismo redox por un incremento en la producción de ROS, infección, acumulación de agregados proteicos o hipoxia (Tatsuta & Langer, 2008; Kroemer *et al.*, 2010).

Las células deficitarias en frataxina y las deficitarias en GDAP1 muestran un incremento en la expresión del marcador de autofagosomas LC3B-II, lo que sugiere que la reducción de frataxina y de GDAP1 induce la autofagia en condiciones basales. Además observamos un aumento de otros marcadores de autofagia, como la catepsina D o p62. Por otra parte, las imágenes de microscopía electrónica de las células con mayor silenciamiento de *FXN*, el clon FXN-138.1, nos revelan la presencia de numerosas vesículas lisosomales, y también encontramos cuerpos

residuales, que son lisosomas secundarios con restos de material no digerible, que en células nerviosas se conocen como pigmentos de lipofuscina. La presencia de estas estructuras se relaciona con el proceso de autofagia.

La señalización del proceso de autofagia funciona correctamente en estas células, ya que observamos un aumento del marcador LC3B-II con el tratamiento de bafilomicina A1 o ante privación nutricional y su disminución al administrar a las células insulina o PMA, que activan la ruta mTORC1. Dados estos resultados, el aumento en la actividad autofágica observada en las células con déficit de frataxina y de GDAP1 podría darse como una respuesta citoprotectora ante un estado celular alterado. El déficit de frataxina produce una disfunción mitocondrial debido a un déficit en la cadena de transporte de electrones y a una despolarización mitocondrial, causando un aumento de estrés oxidativo celular. El déficit de GDAP1 causa elevados niveles de estrés oxidativo celular. Mediante el incremento de la autofagia en ambos tipos de células deficitarias se intentaría restablecer la fisiología celular eliminando las mitocondrias defectuosas.

Existen algunos trabajos en los que se ha relacionado el déficit de frataxina con el proceso de autofagia. En un modelo de ratón *knockout* de *Frda* condicional en tejido nervioso observaron mediante microscopía electrónica características de autofagia en las neuronas sensitivas del DRG (Simon *et al.*, 2004). En concreto observaron vacuolas gigantes que consideraron autofagosomas, acumulación de depósitos de lipofuscina, un incremento de lisosomas y mitocondrias anormales, con crestas desorganizadas y algunas hinchadas, cercanas a vacuolas autofágicas. Los autores sugirieron que el mecanismo de degeneración en las neuronas de DRG de este modelo de déficit de frataxina lo producía el incremento del proceso autofágico. En el caso de nuestro modelo celular de déficit de frataxina, pensamos que el aumento de autofagia no es un mecanismo de degeneración, sino que sería una respuesta citoprotectora ante la disfunción mitocondrial y el incremento en el estrés oxidativo causado por el déficit de frataxina. Cuando la autofagia no es suficiente para restablecer la función celular, es cuando se activa la apoptosis en estas células. Pero no podemos descartar que el efecto protector inicial de la autofagia incrementada acabe desencadenando la muerte celular, como proponen Simon *et al.* (2004), ya que por ejemplo los depósitos de

lipofuscina pueden producir a la larga un efecto citotóxico (Terman *et al.*, 2008; Terman *et al.*, 2010).

También en el modelo de ratón “humanizado” YG8R, que carece del gen *Frda* murino pero contiene el gen humano con la expansión patogénica GAA en su apropiado contexto genético se observó mediante microscopía electrónica vacuolización y depósitos de lipofuscina en células de DRG (Al-Mahdawi *et al.*, 2006).

Recientemente también se ha observado que la reducción de frataxina causa un aumento en la autofagia basal en *C. elegans*, por detección mediante microscopía de fluorescencia de un patrón punteado de LGG-1, que es el ortólogo de LC3 en *C. elegans*, fusionado a GFP. Y en el mismo trabajo observaron un aumento de autofagia en linfoblastos derivados de pacientes FRDA mediante la detección por *Western Blot* de un incremento en el marcador autofágico LC3B-II (Schiavi *et al.*, 2013).

Todos estos trabajos sugieren que la autofagia podría estar incrementada en las células deficitarias en frataxina, bien como un mecanismo compensatorio ante la disfunción mitocondrial causada por la carencia de frataxina, o bien podría ser una característica previa a la neurodegeneración que sufren las neuronas deficitarias en frataxina. En el caso de que fuera un mecanismo compensatorio que no siempre se observa en las células afectadas, la inducción de la autofagia en estas células podría emplearse como un tratamiento en ataxia de Friedreich. De hecho, en un trabajo en células de levadura con delección de *YFH1* observaron una disminución del estrés oxidativo en las células deficientes en frataxina tratadas con rapamicina (Marobbio *et al.*, 2012). La rapamicina es un compuesto que inhibe a las quinasas TOR (*target of rapamycin*), implicadas en la regulación del crecimiento celular y que cuando están activadas inhiben, entre otros procesos, la autofagia. La rapamicina actúa promoviendo la autofagia al inhibir a las quinasas TOR. Al tratar las células deficitarias en frataxina con rapamicina se activaba la autofagia y se producía la eliminación selectiva de mitocondrias defectuosas. De esta forma se reducía la producción de ROS al eliminar las mitocondrias alteradas que causaban un incremento en el estrés oxidativo en estas células. Recientemente se ha demostrado cómo la administración de rapamicina en un modelo de ratón de síndrome de Leigh incrementa la supervivencia atenuando la progresión de la enfermedad en dicho modelo (Johnson *et al.*, 2013). Aunque la rapamicina no restaura la función mitocondrial debido al déficit en el

complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, promueve la autofagia de mitocondrias disfuncionales, mejorando el fenotipo del ratón *Ndufs4*^{-/-}.

1.5. El déficit de frataxina afecta la activación de la ruta mTOR-C1.

Las células deficitarias en frataxina tratadas con insulina presentan una alteración en la activación de la ruta mTOR-C1, ya que al final de la ruta los niveles de proteína rpS6 fosforilada en los residuos S235 y S236 son mucho menores que en las células control tras el mismo tratamiento. Esta alteración en la activación de la ruta mTOR-C1 no se debe exclusivamente a una respuesta alterada ante la señal de insulina, ya que observamos los mismos resultados en estas células al tratarlas con PMA, otro activador de la ruta mTOR-C1.

La proteína rpS6 forma parte de la subunidad ribosómica 40S en eucariotas superiores. Esta proteína se fosforila en 5 residuos de serina conservados evolutivamente: S235, S236, S240, S244 y S247. La fosforilación de estos residuos es secuencial y es necesaria para la activación de la proteína y la activación traduccional. El estado de rpS6 depende de la acción de kinasas y de fosfatasa. Las kinasas que fosforilan rpS6 son S6Ks (entre ellas la isoforma citosólica p70S6K que hemos evaluado en este trabajo por actuar *downstream* de mTOR-C1) y RSKs. Estas últimas fosforilan exclusivamente a rpS6 en los residuos S235 y S236 y en menor medida que las kinasas S6Ks. Dado que nuestras células deficitarias en frataxina fallan en fosforilar rpS6 únicamente al activar mTOR-C1 con insulina o PMA, pero no en condiciones basales, si el fallo reside en la actividad kinasa de p70S6K, quizá en condiciones basales la fosforilación que observamos en rpS6 se produce por acción de las kinasas RSKs. Pero tampoco podemos descartar que en estas células deficitarias en frataxina se dé mayor actividad de fosfatasa, como la proteína fosfatasa 1, que desfosforilen rpS6 a mayor velocidad que en las células control en estas condiciones.

Inicialmente se postuló una función de rpS6 fosforilada en la regulación de la síntesis proteica global o en la traducción específica de una serie de ARNm, los *TOP mRNAs*, pero posteriores estudios en modelos de déficit de las kinasas S6Ks o de rpS6 fosforilable descartaron estas hipótesis (Meyuhas, 2008). Sin embargo, se ha relacionado la fosforilación de rpS6 con el tamaño y la proliferación celular. El modelo de ratón deficiente en la fosforilación de rpS6, aunque es normal en

aparición, peso, desarrollo y fertilidad, presenta un menor tamaño de células β del páncreas y una densidad celular incrementada para compensar el menor tamaño de estas células, al igual que ocurre en células MEFs derivadas de dicho ratón (Ruvinsky *et al.*, 2005). Además el modelo murino presenta debilidad muscular y menor tamaño de mioblastos fusionados (Ruvinsky *et al.*, 2009). En nuestras células deficitarias en frataxina no observamos una reducción en el tamaño celular ni se da un aumento en la proliferación celular. Pero debemos tener en cuenta que la kinasa p70S6K no sólo fosforila a rpS6, sino también al factor de inicio de la traducción eIF4B, actuando también por esta vía sobre la síntesis proteica. Entonces, si en nuestras células deficitarias en frataxina se produce un defecto en la fosforilación de rpS6 ante determinados estímulos, quizá podría darse un mecanismo compensatorio de activación de la traducción a través de eIF4B.

Por otra parte, recientes trabajos relacionan la ruta mTOR-C1 con la actividad mitocondrial (Johnson *et al.*, 2013; Morita *et al.*, 2013). Por ejemplo, en el trabajo de Morita y colaboradores demostraron que mTOR-C1 modula la actividad y la biogénesis mitocondrial estimulando la traducción de una serie de ARNm relacionados con la mitocondria. Dicha modulación está mediada por las proteínas 4E-BPs, que son dianas de mTOR-C1, al igual que lo es p70S6K, la kinasa de rpS6. En este trabajo se observó que la inhibición de mTOR-C1 en células MCF7 y MEFs bloqueaba la traducción de una serie de ARNm relacionados con la función mitocondrial, como subunidades del complejo V y proteínas de ensamblaje del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Morita *et al.*, 2013). Curiosamente, en el modelo de ratón deficiente en la fosforilación de rpS6, Ruvinsky y colaboradores observaron una disminución en proteínas mitocondriales como subunidades de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Ruvinsky *et al.*, 2009). Con estos datos no sería descabellado pensar que, al igual que las proteínas 4E-BPs, la otra diana *downstream* de mTOR-C1, la kinasa p70S6K y su diana rpS6, también puedan tener relevancia en la función mitocondrial.

1.6. El déficit de frataxina y el déficit de GDAP1 afectan la homeostasis de calcio y causan estrés de retículo endoplasmático.

Como hemos visto, el déficit de frataxina causa una disfunción en la bioenergética mitocondrial. Esta afectación repercute en la homeostasis

del calcio celular, ya que nuestros resultados muestran cómo las mitocondrias deficitarias en frataxina no realizan un adecuado tamponamiento de calcio ante diferentes movilizadores de calcio celular. Esta anomalía se debe a una notable reducción en la captación de calcio por parte de las mitocondrias con déficit de frataxina.

El déficit de frataxina en nuestro modelo celular causa una reducción en la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y como consecuencia se produce una despolarización de la membrana mitocondrial interna y una reducción en la producción de ATP en estas células. La disponibilidad de ATP y un $\Delta\psi_m$ intacto son necesarios para la captación de calcio por parte de la mitocondria, por lo que las células deficitarias en frataxina tienen afectada la capacidad mitocondrial de captación de calcio. A su vez, la captación de calcio por las mitocondrias activa el metabolismo mitocondrial. Si el calcio no es captado eficazmente por las mitocondrias de las células con silenciamiento de *FXN*, la disfunción mitocondrial que ya de por sí tienen estas células es mayor.

Podemos encontrar indicios de la implicación de frataxina en la homeostasis de calcio en un trabajo de Ristow y colaboradores (2000) en el que sobreexpresaron frataxina en adipocitos de ratón. En estas células observaron un aumento en la captación mitocondrial de calcio que causaba una activación en el metabolismo mitocondrial, ya que se producía un aumento en el ciclo del Krebs, en la producción de ATP, en el consumo de oxígeno y en el $\Delta\psi_m$ de estas células (Ristow *et al.*, 2000).

Nuestros resultados muestran cómo la homeostasis de calcio se ve alterada en las células deficitarias en frataxina debido a una afectación en la capacidad mitocondrial de captación de calcio. Sin embargo, quedan algunos puntos por aclarar, como por ejemplo, la observación de un menor pico máximo de calcio citosólico en las células deficitarias en frataxina con respecto a las células control al inducir la entrada de calcio en la célula con veratridina. Este resultado podría indicar una afectación en los canales de entrada de calcio en las células deficitarias en frataxina, bien por una reducción en el número de estos canales y/o menor sensibilidad de estos canales a señales que inducen la entrada de calcio en la célula. Pero también la reducción en el pico máximo de calcio citosólico podría deberse a que las células deficitarias en frataxina ya tienen de por sí un aumento en la concentración citosólica de calcio. Este dato coincidiría con el observado por Mincheva-Tasheva y

colaboradores, que observaron un aumento en los niveles intracelulares de calcio en neuronas de DRG de rata con silenciamiento de *Frda* (Mincheva-Tasheva *et al.*, 2013). Este aumento intracelular de calcio desencadenaría la apoptosis en estas células. Sin embargo en nuestro modelo de silenciamiento de *FXN*, aunque observamos una respuesta alterada de las células en el tamponamiento del calcio intracelular y en la captación mitocondrial de calcio, no observamos un aumento de la apoptosis en condiciones basales. Como hemos comentado anteriormente, este es un modelo transitorio de “déficit agudo de frataxina” mientras que nuestro modelo es de “déficit crónico de frataxina”, lo que contribuye a explicar las diferencias observadas entre ambos modelos con respecto a la apoptosis.

El silenciamiento de *GDAP1* en las células SH-SY5Y también afecta la homeostasis de calcio intracelular, ya que observamos un defecto en el tamponamiento de calcio intracelular al promover su entrada desde el exterior de la célula o vaciando los almacenes de calcio del RE.

Como se ha descrito previamente, el déficit de *GDAP1* afecta al mecanismo de entrada capacitativa de calcio, *SOCE* (Pla-Martin *et al.*, 2013). El vaciado de los depósitos de calcio del RE activa el mecanismo de entrada de calcio extracelular a través de sitios de contacto entre la membrana plasmática y el RE para volver a rellenar los almacenes intracelulares de calcio. La mitocondria participa en este proceso estableciendo contactos con zonas específicas del RE, de forma que el calcio que entra por los canales de la membrana plasmática puede ser captado por las mitocondrias próximas que cargan de nuevo al RE con calcio. Además, el calcio que entra en la mitocondria activa su metabolismo, de forma que se obtiene energía necesaria para la eficacia del *SOCE*. La alteración de este mecanismo en las células deficitarias en *GDAP1* no se debe a una disminución de la captación mitocondrial de calcio, sino a una alteración de la distribución mitocondrial. Previamente se demostró que *GDAP1* interacciona con proteínas del citoesqueleto y que tanto su déficit como la presencia de mutaciones en *GDAP1* afectaba esta interacción (Estela *et al.*, 2011; Pla-Martin *et al.*, 2013). La falta de *GDAP1* impide la interacción de las mitocondrias con el citoesqueleto, afectando el transporte mitocondrial hacia zonas celulares donde se requiere su presencia. En concreto, cuando se activa el mecanismo de *SOCE*, es necesario que haya mitocondrias localizadas en zonas del

subplasmalema celular donde incrementa localmente la concentración de calcio, para que las mitocondrias participen en el tamponamiento de calcio y además proporcionen energía para que el RE se rellene de calcio. El déficit de GDAP1 impide el correcto posicionamiento mitocondrial en estas zonas del subplasmalema, inhibiendo el mecanismo de SOCE.

La alteración en la homeostasis del calcio celular junto con el aumento en los niveles de estrés oxidativo celular provocados por una disfunción de las mitocondrias deficitarias en frataxina repercute en otros orgánulos, como el RE, contribuyendo a la generación de un estrés de RE. Nuestros resultados muestran cómo al inducir un estrés de RE con tapsigarguina en las células deficitarias en frataxina aumenta considerablemente la expresión del marcador de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) BIP/Grp78. La tapsigarguina es un compuesto que inhibe de forma irreversible la bomba SERCA del RE causando un vaciado de los depósitos de calcio en el RE. Como respuesta celular a una salida continuada de calcio del RE se activa la respuesta UPR para tratar de restablecer la situación fisiológica en el RE, pero esta respuesta no es suficiente puesto que las células deficientes en frataxina acaban muriendo por apoptosis. De esta forma nuestros resultados muestran que el déficit de frataxina aumenta la susceptibilidad celular al estrés de RE, desencadenando la apoptosis cuando las células están sometidas a un estrés sostenido o a un daño agudo. El déficit en la captación mitocondrial de calcio por parte de las células deficitarias en frataxina causaría un aumento en los niveles intracelulares de calcio, por lo que es plausible que la apoptosis inducida por el estrés de RE sea consecuencia de un manejo anómalo de calcio por la mitocondria. Este incremento de calcio citosólico causaría una toxicidad celular que podría ser eliminada normalizando el calcio intracelular con el uso de quelantes de calcio en estas células. De hecho, en un trabajo de Wong y colaboradores observaron una disminución en la apoptosis inducida por estrés oxidativo en fibroblastos FRDA tratados con el quelante de calcio BAPTA-AM (Wong *et al.*, 1999).

Además de la afectación en la capacidad mitocondrial de captación de calcio por el déficit bioenergético causado por la falta de frataxina, un incremento en las especies reactivas del oxígeno (ROS) también puede contribuir a la desregulación de la homeostasis del calcio en estas células. Las ROS pueden causar oxidación de moléculas celulares y esto afecta a

su actividad. Por ejemplo, las modificaciones oxidativas en canales de calcio como los receptores InsP₃R o RyR en el RE aumentan su permeabilidad al calcio, causando un incremento en su salida desde el RE, y también pueden causar la inactivación de los intercambiadores de Na⁺/Ca²⁺ en la membrana plasmática, y de la bomba SERCA en el RE causando todo ello un aumento en la concentración citosólica de calcio (Kourie, 1998; Chakraborti *et al.*, 1999; Hidalgo *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2011). Por esto consideramos que el uso de compuestos quelantes de calcio tendría un papel muy beneficioso frente al efecto citotóxico que tendrían conjuntamente una elevada producción de ROS y una elevada concentración citosólica de calcio en las células deficitarias en frataxina.

Como hemos mencionado, en un trabajo previo en nuestro laboratorio, se observó que las células deficitarias en GDAP1 presentaban estrés de RE (Pla Martín, 2012).

Se ha descrito que durante fases tempranas de estrés de RE, las mitocondrias se localizan próximas a este orgánulo proporcionando la energía necesaria para la respuesta adaptativa celular que restablezca el estrés de RE (Bravo *et al.*, 2011). De esta forma la mitocondria participa en la respuesta adaptativa celular, produciéndose un incremento localizado de la bioenergética mitocondrial en zonas próximas al RE, determinando el destino celular tras la activación de la respuesta UPR. Si la disminución en los niveles de GDAP1 causa un estrés de RE, la célula intentaría restablecer la situación normal con la ayuda de las mitocondrias, proporcionando la energía necesaria al RE para que se efectúe la respuesta UPR. Esto podría explicar el aumento en los niveles de ATP celulares y en el consumo de oxígeno observado en nuestras células deficitarias en GDAP1.

Sin embargo, dado que GDAP1 interacciona con proteínas del citoesqueleto, el déficit de GDAP1 afectaría esta interacción, lo que impediría el correcto posicionamiento mitocondrial y su interacción con el RE. Por tanto, un aumento prolongado de estrés de RE sin una respuesta eficaz por parte de las células deficitarias en GDAP1 acabaría por desencadenar la muerte celular por apoptosis. En concreto, en las células deficitarias en GDAP1 se observó un incremento en la apoptosis tras el tratamiento prolongado con tapsigarguina en combinación con bafilomicina A1. Estos resultados sugerían que el estrés de RE activaba en las células deficitarias en GDAP1 el mecanismo de autofagia, como

hemos observado en este trabajo. Pero cuando la autofagia no es capaz de restablecer la situación normal celular, por acción de la bafilomicina A1, las células deficitarias en GDAP1 acaban activando la apoptosis.

2. Papel de la mitocondria en la neurodegeneración.

En el presente trabajo hemos querido comparar los mecanismos comunes de neurodegeneración entre dos modelos de neuropatías periféricas: ataxia de Friedreich (FRDA) y Charcot-Marie-Tooth (CMT) tipo 4A/2K. Con nuestros resultados hemos podido determinar que las alteraciones celulares en común que tienen estos dos modelos son: la alteración en la morfología mitocondrial, el incremento en el estrés oxidativo celular, la afectación en la homeostasis del calcio, el incremento en la susceptibilidad a estrés de retículo endoplasmático (RE) y el aumento en la autofagia basal. Estos son los procesos alterados que tienen en común nuestros modelos celulares de FRDA y CMT4A/2K, aunque podemos establecer diferencias en estos procesos.

La morfología mitocondrial está alterada en ambos modelos de forma diferente. Mientras que el déficit de frataxina en el modelo celular de FRDA causa un aumento en la morfología tubular de las mitocondrias, como consecuencia de un aumento en la fusión mitocondrial, el déficit de GDAP1 en el modelo celular de CMT4A/2K causa un incremento en la fragmentación mitocondrial.

El estrés oxidativo observado en ambos modelos tiene un origen diferente. El déficit de frataxina en el caso de FRDA produce un defecto en la respiración mitocondrial alterando la actividad en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el $\Delta\psi_m$, el consumo de oxígeno y la producción de ATP. Este defecto en la respiración mitocondrial causa un aumento en la producción de ROS, lo que produce el estrés oxidativo celular observado en las células deficitarias en frataxina. Por su parte, en el caso del modelo celular de CMT4A/2K no podemos asignar un origen mitocondrial al estrés oxidativo observado en las células deficitarias en GDAP1, puesto que no observamos en estas células una afectación de la respiración mitocondrial, aunque observamos un aumento en la producción de ATP y en el consumo de oxígeno. Sin embargo, parece probable que el estrés oxidativo en estas células se origine en el RE, ya

que en estas células observamos una mayor susceptibilidad al estrés de RE.

La afectación en la homeostasis de calcio observada en ambos modelos celulares también presenta diferencias. Tanto el déficit de frataxina como el de GDAP1 afectan al tamponamiento celular de calcio ante diferentes movilizadores de este ion. Pero en el caso de FRDA esta alteración se debe a una severa reducción en la captación de calcio por parte de las mitocondrias deficitarias en frataxina, mientras que en el caso de CMT4A/2K las mitocondrias con déficit en GDAP1 sí que son capaces de captar calcio. El defecto en el tamponamiento de calcio en este caso se debe probablemente a un incorrecto posicionamiento mitocondrial en zonas específicas en las que incrementa la concentración citosólica de calcio hasta donde las mitocondrias con déficit en GDAP1 no consiguen posicionarse debido a una alteración en la interacción de estas mitocondrias con el citoesqueleto celular.

Todos estos procesos comunes alterados en los modelos celulares de FRDA y CMT4A/2K son procesos mitocondriales o están íntimamente relacionados con la mitocondria, por lo que podemos afirmar que la mitocondria tiene un papel muy importante en la neurodegeneración que ocurre en estas neuropatías.

Pero no sólo encontramos estos procesos mitocondriales alterados en estas dos neuropatías, sino que podemos encontrar otras neuropatías con una disfunción mitocondrial en común. Ejemplos de neuropatías con una disfunción mitocondrial primaria son la atrofia óptica hereditaria de Leber y el síndrome de neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa, ambas causadas por mutaciones en el ADNmt que codifican respectivamente subunidades del complejo I y de la ATPasa de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Holt *et al.*, 1990; Hudson *et al.*, 2008).

Sin embargo, también hay neuropatías en que se da una disfunción mitocondrial y que están causadas por mutaciones en genes nucleares que codifican proteínas de localización mitocondrial, como por ejemplo la atrofia óptica dominante causada por mutaciones en *OPA1* que codifica la proteína de membrana mitocondrial interna Opa1 implicada en fusión mitocondrial (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000), CMT2A causada por mutaciones en *MFN2*, que codifica la proteína de membrana mitocondrial externa Mfn2 implicada en fusión mitocondrial (Zuchner *et al.*, 2004) o la paraplejía espástica hereditaria de herencia autosómica recesiva (De Michele *et al.*, 1998) causada por mutaciones en

SPG7, que codifica una subunidad de una metaloproteasa mitocondrial (Casari *et al.*, 1998). La paraplejia espástica hereditaria afecta principalmente al SNC, pero muestra una axonopatía *dying back* afectando las terminaciones distales de los axones sensitivos y motores de la médula espinal, sin pérdida del soma neuronal. Este proceso se asemeja a la neurodegeneración *dying back* presente en varias neuropatías del SNP, como en FRDA y en CMT4A/2K. *SPG7* codifica la proteína paraplegina, que es una subunidad componente de una metaloproteasa mitocondrial localizada en la membrana mitocondrial interna y está implicada en el reciclaje de proteínas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Los estudios en biopsias de pacientes han revelado una afectación en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y un aumento en la susceptibilidad a estrés oxidativo (Casari *et al.*, 1998; Atorino *et al.*, 2003). Por su parte, el modelo murino deficiente en paraplegina presenta una degeneración axonal progresiva en los tractos espinocerebelosos largos ascendentes y descendentes, en los nervios ópticos y en los nervios ciáticos, además de presentar mitocondrias gigantes y anormales específicamente en las regiones distales y en las terminaciones sinápticas de los axones largos (Ferreirinha *et al.*, 2004).

También podemos encontrar afectación mitocondrial en neuropatías en las que el defecto que las causa no tiene su origen en proteínas exclusivamente mitocondriales. En algunas neuropatías la disfunción mitocondrial viene dada por mutaciones en genes que codifican proteínas localizadas en varios compartimentos intracelulares, como en la enfermedad de Parkinson asociada a mutaciones en los genes que codifican las proteínas parkina, DJ-1 o PINK1 (Dodson & Guo, 2007), o formas familiares de esclerosis lateral amiotrófica, causada por mutaciones en *SOD1*, que codifica la enzima antioxidante CuZnSOD (Rosen, 1993). Por ejemplo, CuZnSOD se localiza principalmente en el citosol, pero también puede encontrarse en la matriz mitocondrial. Se ha descrito que Sod1 mutante forma agregados en la mitocondria causando la disfunción mitocondrial mediante una interacción aberrante con chaperonas, lo que afectaría al transporte mitocondrial de proteínas (Vijayvergiya *et al.*, 2005). Diversos estudios en líneas celulares con mutaciones en *SOD1* asociadas a esclerosis lateral amiotrófica han demostrado una afectación de la respiración mitocondrial por defectos en enzimas de la cadena de transporte mitocondrial, pérdida del $\Delta\psi_m$,

disminución en la producción de ATP y un aumento en la producción de ROS (Pasinelli & Brown, 2006). Por otra parte, los modelos murinos de esclerosis lateral amiotrófica con mutaciones en *SOD1* también presentan alteraciones en la respiración mitocondrial asociadas a un daño oxidativo mitocondrial y a alteraciones en la morfología mitocondrial (Vinsant *et al.*, 2013a; b), afectación en la homeostasis de calcio asociada a una disminución en la capacidad mitocondrial de captación de calcio (Damiano *et al.*, 2006), y alteraciones en el proceso autofágico (Crippa *et al.*, 2013).

Incluso podemos encontrar afectación de estos procesos mitocondriales en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Huntington. En estas enfermedades neurodegenerativas la implicación mitocondrial no es la causa primaria, pero tiene una importante contribución en la neurodegeneración. Con todo esto consideramos que la disfunción mitocondrial sería un desencadenante de la neurodegeneración y proponemos que los procesos mitocondriales alterados que hemos presentado deberían considerarse para el estudio de enfermedades neurodegenerativas raras en las que se desconoce el mecanismo fisiopatológico que conduce a la muerte neuronal. De esta forma, procesos mitocondriales como la dinámica mitocondrial, la comunicación de la mitocondria con otros orgánulos como el RE, el estudio de la homeostasis de calcio o la autofagia tienen muchas probabilidades de estar alterados en las enfermedades neurodegenerativas.

Además, aunque la existencia de mecanismos comunes de disfunción mitocondrial nos ayudaría a comprender el papel de la mitocondria en la neurodegeneración, también es importante considerar cuáles son las causas primarias de disfunción mitocondrial que conducen a la degeneración neuronal para poder desarrollar y aplicar tratamientos más ajustados a la enfermedad.

CONCLUSIONES

“Cuando un hombre de ciencia busca conocimientos, aun no hallándolos en su totalidad, descubre fragmentos muy importantes, que son precisamente los que constituyen la ciencia.”

Claude Bernard

1. El déficit de frataxina en las células SH-SY5Y causa un retraso en el crecimiento celular, que no afecta a la viabilidad celular, no está asociado a la apoptosis y está asociado a la senescencia celular. Por el contrario, el déficit de GDAP1 en las células SH-SY5Y no afecta al crecimiento celular y de la misma manera no afecta la viabilidad celular ni está asociado a la apoptosis.
2. La reducción de frataxina afecta a la función mitocondrial causando una disminución en la actividad del complejo IV de la cadena de transporte de electrones, un déficit en la producción de ATP, una disminución en el consumo de oxígeno y una despolarización de la membrana mitocondrial interna. Estas alteraciones sugieren que el déficit de frataxina causa una disfunción en el metabolismo energético mitocondrial. Por el contrario, el déficit de GDAP1 provoca un incremento en el consumo de oxígeno que parece no afectar la respiración mitocondrial.
3. Tanto el déficit en frataxina como el déficit en GDAP1 producen un incremento en el estrés oxidativo celular. Mientras que en el modelo celular de ataxia de Friedreich el origen de dicho estrés oxidativo es la disfunción mitocondrial causada por el déficit de frataxina, no podemos asignar un origen mitocondrial al estrés oxidativo causado por el déficit de GDAP1.
4. Tanto el déficit en frataxina como el déficit en GDAP1 causan una alteración en la dinámica mitocondrial. Mientras que el déficit de GDAP1 causa un incremento en la fragmentación mitocondrial, el déficit de frataxina promueve un patrón mitocondrial tubular, lo que sugiere que estas células tienen una mayor actividad de fusión mitocondrial.
5. Tanto la reducción de frataxina como la de GDAP1 causan un aumento en el proceso de autofagia basal. Dicho aumento es una

respuesta citoprotectora ante la disfunción mitocondrial causada por el déficit de ambas proteínas.

6. Tanto el déficit de frataxina como el de GDAP1 afectan a la homeostasis de calcio. Mientras que el déficit de frataxina causa una reducción en la capacidad mitocondrial de captación de calcio, el déficit de GDAP1 no afecta dicha capacidad.
7. La alteración en la homeostasis de calcio celular junto con el aumento en los niveles de estrés oxidativo celular contribuyen a un estrés de retículo endoplasmático en las células deficitarias en frataxina y en GDAP1, activando el proceso de apoptosis con un estrés prolongado.
8. Aunque frataxina y GDAP1 realizan funciones celulares diferentes, su localización mitocondrial las implican en procesos mitocondriales y celulares comunes. Los modelos de neuropatía FRDA y CMT4A/2K por déficit en las respectivas proteínas tienen en común: una modificación en la morfología mitocondrial, un incremento en el estrés oxidativo celular, afectación de la homeostasis de calcio, un incremento en la susceptibilidad a estrés de retículo endoplasmático y un aumento en la autofagia basal.
9. Las diferencias observadas entre ambos modelos de neuropatía, como la alteración del metabolismo energético mitocondrial, la afectación en la captación mitocondrial de calcio o el origen del estrés oxidativo celular, pueden explicarse por la localización de ambas proteínas en diferentes compartimentos mitocondriales: la matriz mitocondrial en el caso de frataxina y la membrana mitocondrial externa en el caso de GDAP1.

BIBLIOGRAFÍA

*“El leer sin pensar nos hace una mente desordenada.
El pensar sin leer nos hace desequilibrados.”*

Confucio.

- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Ruddle, P., Carroll, C., Webster, Z. & Pook, M. (2004) GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics*, **84**, 301-310.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Hughes, S., Webster, Z., Blake, J., Cooper, J.M., King, R. & Pook, M.A. (2006) GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics*, **88**, 580-590.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. & Wissinger, B. (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*, **26**, 211-215.
- Alper, G. & Narayanan, V. (2003) Friedreich's ataxia. *Pediatr Neurol*, **28**, 335-341.
- Anderson, P.R., Kirby, K., Hilliker, A.J. & Phillips, J.P. (2005) RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Hum Mol Genet*, **14**, 3397-3405.
- Andersson, D.C., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Meli, A.C., Umanskaya, A., Xie, W., Shiomi, T., Zalk, R., Lacampagne, A. & Marks, A.R. (2011) Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab*, **14**, 196-207.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E. & Starkov, A.A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, **70**, 200-214.
- Atorino, L., Silvestri, L., Koppen, M., Cassina, L., Ballabio, A., Marconi, R., Langer, T. & Casari, G. (2003) Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol*, **163**, 777-787.

- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M. & Kaplan, J. (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*, **276**, 1709-1712.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. & Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **120**, 483-495.
- Baxter, R.V., Ben Othmane, K., Rochelle, J.M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J.E., Gilbert, J.R., Pericak-Vance, M.A. & Vance, J.M. (2002) Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet*, **30**, 21-22.
- Ben Othmane, K., Hentati, F., Lennon, F., Ben Hamida, C., Blel, S., Roses, A.D., Pericak-Vance, M.A., Ben Hamida, M. & Vance, J.M. (1993) Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. *Hum Mol Genet*, **2**, 1625-1628.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. & Rossignol, R. (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci*, **120**, 838-848.
- Berciano, J., Gallardo, E., García, A., Pelayo-Negro, A.L., Infante, J. & Combarros, O. (2011) Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: revisión con énfasis en la fisiopatología del pie cavo. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*, **55**, 140-150.
- Berlett, B.S. & Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, **272**, 20313-20316.
- Bidichandani, S.I., Ashizawa, T. & Patel, P.I. (1998) The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet*, **62**, 111-121.

- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. & Freedman, L.S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, **38**, 3751-3757.
- Boitier, E., Rea, R. & Duchen, M.R. (1999) Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca²⁺ waves in rat cortical astrocytes. *J Cell Biol*, **145**, 795-808.
- Bowling, A.C. & Beal, M.F. (1995) Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci*, **56**, 1151-1171.
- Bradley, J.L., Blake, J.C., Chamberlain, S., Thomas, P.K., Cooper, J.M. & Schapira, A.H. (2000) Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*, **9**, 275-282.
- Bravo, R., Vicencio, J.M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J.P., Bui, M., Quiroga, C., Rodriguez, A.E., Verdejo, H.E., Ferreira, J., Iglewski, M., Chiong, M., Simmen, T., Zorzano, A., Hill, J.A., Rothermel, B.A., Szabadkai, G. & Lavandero, S. (2011) Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci*, **124**, 2143-2152.
- Bulteau, A.L., O'Neill, H.A., Kennedy, M.C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G. & Szweda, L.I. (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science*, **305**, 242-245.
- Bulteau, A.L., Planamente, S., Jornea, L., Dur, A., Lesuisse, E., Camadro, J.M. & Auchere, F. (2012) Changes in mitochondrial glutathione levels and protein thiol oxidation in yfh1 yeast cells and the lymphoblasts of patients with Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta*, **1822**, 212-225.
- Cali, T., Ottolini, D. & Brini, M. (2012) Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of mitochondrial activities. *Adv Exp Med Biol*, **942**, 53-73.
- Calmels, N., Seznec, H., Villa, P., Reutenauer, L., Hibert, M., Haiech, J., Rustin, P., Koenig, M. & Puccio, H. (2009) Limitations in a frataxin knockdown cell model for Friedreich ataxia in a high-throughput drug screen. *BMC Neurol*, **9**, 46.

- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S.J., Faucheux, B., Trouillas, P., Authier, F.J., Durr, A., Mandel, J.L., Vescovi, A., Pandolfo, M. & Koenig, M. (1997) Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet*, **6**, 1771-1780.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S.I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P.I., Di Donato, S., Mandel, J.L., Coccozza, S., Koenig, M. & Pandolfo, M. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, **271**, 1423-1427.
- Carletti, B., Piermarini, E., Tozzi, G., Travaglini, L., Torraco, A., Pastore, A., Sparaco, M., Petrillo, S., Carrozzo, R., Bertini, E. & Piemonte, F. (2014) Frataxin Silencing Inactivates Mitochondrial Complex I in NSC34 Motoneuronal Cells and Alters Glutathione Homeostasis. *Int J Mol Sci*, **15**, 5789-5806.
- Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., Durr, A., Fontaine, B. & Ballabio, A. (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*, **93**, 973-983.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Bonneau, D., Verny, C., Procaccio, V., Reynier, P. & Ferre, M. (2011) A locus-specific database for mutations in GDAP1 allows analysis of genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth diseases type 4A and 2K. *Orphanet J Rare Dis*, **6**, 87.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Malinge, M.C., Letournel, F., Nicolas, G., Richard, L., Ferre, M., Verny, C., Dubas, F., Procaccio, V., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D. & Reynier, P. (2009) Mitochondrial

complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics*, **10**, 145-150.

Cavadini, P., Adamec, J., Taroni, F., Gakh, O. & Isaya, G. (2000a) Two-step processing of human frataxin by mitochondrial processing peptidase. Precursor and intermediate forms are cleaved at different rates. *J Biol Chem*, **275**, 41469-41475.

Cavadini, P., Gellera, C., Patel, P.I. & Isaya, G. (2000b) Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet*, **9**, 2523-2530.

Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B. & Scorrano, L. (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 15927-15932.

Clapham, D.E. (1995) Calcium signaling. *Cell*, **80**, 259-268.

Claramunt, R., Pedrola, L., Sevilla, T., Lopez de Munain, A., Berciano, J., Cuesta, A., Sanchez-Navarro, B., Millan, J.M., Saifi, G.M., Lupski, J.R., Vilchez, J.J., Espinos, C. & Palau, F. (2005) Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet*, **42**, 358-365.

Cnop, M., Mulder, H. & Igoillo-Esteve, M. (2013) Diabetes in Friedreich ataxia. *J Neurochem*, **126 Suppl 1**, 94-102.

Combarros, O., Calleja, J., Polo, J.M. & Berciano, J. (1987) Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurol Scand*, **75**, 9-12.

Cossee, M., Durr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.H., Kohlschutter, A., Muller, U., Mandel, J.L., Brice, A., Koenig, M., Cavalcanti, F., Tammaro, A., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Labuda, M., Montermini, L., Poirier, J. & Pandolfo, M. (1999) Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann Neurol*, **45**, 200-206.

- Cossee, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dolle, P. & Koenig, M. (2000) Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet*, **9**, 1219-1226.
- Cossee, M., Schmitt, M., Campuzano, V., Reutenauer, L., Moutou, C., Mandel, J.L. & Koenig, M. (1997) Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **94**, 7452-7457.
- Crippa, V., Boncoraglio, A., Galbiati, M., Aggarwal, T., Rusmini, P., Giorgetti, E., Cristofani, R., Carra, S., Pennuto, M. & Poletti, A. (2013) Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. *Front Cell Neurosci*, **7**, 234.
- Cuervo, A.M. (2008) Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet*, **24**, 604-612.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., Garcia-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marin, I., Vilchez, J.J. & Palau, F. (2002) The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet*, **30**, 22-25.
- Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S. & Chakraborti, S. (1999) Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal*, **11**, 77-85.
- Chamberlain, S., Shaw, J., Rowland, A., Wallis, J., South, S., Nakamura, Y., von Gabain, A., Farrall, M. & Williamson, R. (1988) Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature*, **334**, 248-250.
- Chan, D.C. (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, **125**, 1241-1252.

- Chen, H., Chomyn, A. & Chan, D.C. (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, **280**, 26185-26192.
- Chen, H., McCaffery, J.M. & Chan, D.C. (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, **130**, 548-562.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L. & Lesnefsky, E.J. (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*, **278**, 36027-36031.
- Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M. & Manfredi, G. (2006) Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem*, **96**, 1349-1361.
- De Castro, M., Garcia-Planells, J., Monros, E., Canizares, J., Vazquez-Manrique, R., Vilchez, J.J., Urtasun, M., Lucas, M., Navarro, G., Izquierdo, G., Molto, M.D. & Palau, F. (2000) Genotype and phenotype analysis of Friedreich's ataxia compound heterozygous patients. *Hum Genet*, **106**, 86-92.
- De Michele, G., De Fusco, M., Cavalcanti, F., Filla, A., Marconi, R., Volpe, G., Monticelli, A., Ballabio, A., Casari, G. & Coccozza, S. (1998) A new locus for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 16q24.3. *Am J Hum Genet*, **63**, 135-139.
- De Michele, G., Filla, A., Cavalcanti, F., Di Maio, L., Pianese, L., Castaldo, I., Calabrese, O., Monticelli, A., Varrone, S., Campanella, G. & et al. (1994) Late onset Friedreich's disease: clinical features and mapping of mutation to the FRDA locus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **57**, 977-979.
- De Michele, G., Filla, A., Cavalcanti, F., Tammara, A., Monticelli, A., Pianese, L., Di Salle, F., Perreti, A., Santoro, L., Caruso, G. & Coccozza, S. (2000) Atypical Friedreich ataxia phenotype associated with a novel missense mutation in the X25 gene. *Neurology*, **54**, 496-499.

- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabo, I. & Rizzuto, R. (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, **476**, 336-340.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelles, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. & Hamel, C.P. (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*, **26**, 207-210.
- Denton, R.M. & McCormack, J.G. (1986) The calcium sensitive dehydrogenases of vertebrate mitochondria. *Cell Calcium*, **7**, 377-386.
- Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.I., Ristow, M. & Shoelson, S.E. (2000) Crystal structure of human frataxin. *J Biol Chem*, **275**, 30753-30756.
- DiMauro, S. & Schon, E.A. (2008) Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, **31**, 91-123.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. & et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9363-9367.
- Dinsdale, D., Zhuang, J. & Cohen, G.M. (1999) Redistribution of cytochrome c precedes the caspase-dependent formation of ultracondensed mitochondria, with a reduced inner membrane potential, in apoptotic monocytes. *Am J Pathol*, **155**, 607-618.
- Dodson, M.W. & Guo, M. (2007) Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*, **17**, 331-337.
- Duchen, M.R. (1999) Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol*, **516 (Pt 1)**, 1-17.

- Duchen, M.R. (2004) Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*, **53 Suppl 1**, S96-102.
- Dyck, P.J. & Lambert, E.H. (1968a) Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol*, **18**, 603-618.
- Dyck, P.J. & Lambert, E.H. (1968b) Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol*, **18**, 619-625.
- Eskelinen, E.L. (2005) Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy*, **1**, 1-10.
- Estela, A., Pla-Martin, D., Sanchez-Piris, M., Sesaki, H. & Palau, F. (2011) Charcot-Marie-Tooth-related gene GDAP1 complements cell cycle delay at G2/M phase in *Saccharomyces cerevisiae* fis1 gene-defective cells. *J Biol Chem*, **286**, 36777-36786.
- Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S. & Mihara, K. (2003) Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem*, **134**, 333-344.
- Ferreirinha, F., Quattrini, A., Pirozzi, M., Valsecchi, V., Dina, G., Broccoli, V., Auricchio, A., Piemonte, F., Tozzi, G., Gaeta, L., Casari, G., Ballabio, A. & Rugarli, E.I. (2004) Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J Clin Invest*, **113**, 231-242.
- Fontanesi, F., Soto, I.C. & Barrientos, A. (2008) Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life*, **60**, 557-568.
- Foury, F. & Cazzalini, O. (1997) Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett*, **411**, 373-377.

- Friedreich, N. (1863a) Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, **26**.
- Friedreich, N. (1863b) Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, **27**, 1-26.
- Garcia-Gimenez, J.L., Gimeno, A., Gonzalez-Cabo, P., Dasi, F., Bolinches-Amoros, A., Molla, B., Palau, F. & Pallardo, F.V. (2011) Differential expression of PGC-1alpha and metabolic sensors suggest age-dependent induction of mitochondrial biogenesis in Friedreich ataxia fibroblasts. *PLoS One*, **6**, e20666.
- Gellera, C., Castellotti, B., Mariotti, C., Mineri, R., Seveso, V., Didonato, S. & Taroni, F. (2007) Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics*, **8**, 289-299.
- Gerber, J., Muhlenhoff, U. & Lill, R. (2003) An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep*, **4**, 906-911.
- Gibson, T.J., Koonin, E.V., Musco, G., Pastore, A. & Bork, P. (1996) Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci*, **19**, 465-468.
- Gonzalez-Cabo, P., Bolinches-Amoros, A., Cabello, J., Ros, S., Moreno, S., Baylis, H.A., Palau, F. & Vazquez-Manrique, R.P. (2011) Disruption of the ATP-binding cassette B7 (ABTM-1/ABCB7) induces oxidative stress and premature cell death in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, **286**, 21304-21314.
- Gonzalez-Cabo, P., Vazquez-Manrique, R.P., Garcia-Gimeno, M.A., Sanz, P. & Palau, F. (2005) Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum Mol Genet*, **14**, 2091-2098.
- Greene, E., Mahishi, L., Entezam, A., Kumari, D. & Usdin, K. (2007) Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res*, **35**, 3383-3390.

- Grivennikova, V.G. & Vinogradov, A.D. (2006) Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta*, **1757**, 553-561.
- Hah, Y.S., Noh, H.S., Ha, J.H., Ahn, J.S., Hahm, J.R., Cho, H.Y. & Kim, D.R. (2012) Cathepsin D inhibits oxidative stress-induced cell death via activation of autophagy in cancer cells. *Cancer Lett*, **323**, 208-214.
- Hajnoczky, G., Hager, R. & Thomas, A.P. (1999) Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca²⁺. *J Biol Chem*, **274**, 14157-14162.
- Hanauer, A., Chery, M., Fujita, R., Driesel, A.J., Gilgenkrantz, S. & Mandel, J.L. (1990) The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *Am J Hum Genet*, **46**, 133-137.
- Harding, A.E. (1981) Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain*, **104**, 589-620.
- Hay, N. & Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, **18**, 1926-1945.
- Herman, D., Jenssen, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S.L. & Gottesfeld, J.M. (2006) Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol*, **2**, 551-558.
- Hick, A., Wattenhofer-Donze, M., Chintawar, S., Tropel, P., Simard, J.P., Vaucamps, N., Gall, D., Lambot, L., Andre, C., Reutenauer, L., Rai, M., Teletin, M., Messaddeq, N., Schiffmann, S.N., Viville, S., Pearson, C.E., Pandolfo, M. & Puccio, H. (2013) Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Dis Model Mech*, **6**, 608-621.
- Hidalgo, C., Donoso, P. & Carrasco, M.A. (2005) The ryanodine receptors Ca²⁺ release channels: cellular redox sensors? *IUBMB Life*, **57**, 315-322.

- Holt, I.J., Harding, A.E., Petty, R.K. & Morgan-Hughes, J.A. (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet*, **46**, 428-433.
- Hoth, M., Fanger, C.M. & Lewis, R.S. (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol*, **137**, 633-648.
- Huber, N., Guimaraes, S., Schrader, M., Suter, U. & Niemann, A. (2013) Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO Rep*, **14**, 545-552.
- Hudson, G., Yu-Wai-Man, P. & Chinnery, P.F. (2008) Leber hereditary optic neuropathy. *Expert Opin Med Diagn*, **2**, 789-799.
- Hwang, E.S., Yoon, G. & Kang, H.T. (2009) A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 2503-2524.
- Ichimura, Y. & Komatsu, M. (2010) Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol*, **32**, 431-436.
- Jiang, J., Zuo, Y. & Gu, Z. (2013) Rapamycin protects the mitochondria against oxidative stress and apoptosis in a rat model of Parkinson's disease. *Int J Mol Med*, **31**, 825-832.
- Jitpimolmard, S., Small, J., King, R.H., Geddes, J., Misra, P., McLaughlin, J., Muddle, J.R., Cole, M., Harding, A.E. & Thomas, P.K. (1993) The sensory neuropathy of Friedreich's ataxia: an autopsy study of a case with prolonged survival. *Acta Neuropathol*, **86**, 29-35.
- Johnson, S.C., Yanos, M.E., Kayser, E.B., Quintana, A., Sangesland, M., Castanza, A., Uhde, L., Hui, J., Wall, V.Z., Gagnidze, A., Oh, K., Wasko, B.M., Ramos, F.J., Palmiter, R.D., Rabinovitch, P.S., Morgan, P.G., Sedensky, M.M. & Kaeberlein, M. (2013) mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science*, **342**, 1524-1528.

- Jouaville, L.S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G.A. & Rizzuto, R. (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13807-13812.
- Kiffin, R., Bandyopadhyay, U. & Cuervo, A.M. (2006) Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 152-162.
- Kijima, K., Numakura, C., Izumino, H., Umetsu, K., Nezu, A., Shiiki, T., Ogawa, M., Ishizaki, Y., Kitamura, T., Shozawa, Y. & Hayasaka, K. (2005) Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet*, **116**, 23-27.
- Kim, H.J., Khalimonchuk, O., Smith, P.M. & Winge, D.R. (2012) Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta*, **1823**, 1604-1616.
- Klionsky, D.J., Cuervo, A.M. & Seglen, P.O. (2007) Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*, **3**, 181-206.
- Koeppen, A.H. & Mazurkiewicz, J.E. (2013) Friedreich ataxia: neuropathology revised. *J Neuropathol Exp Neurol*, **72**, 78-90.
- Komatsu, M. & Ichimura, Y. (2010) Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett*, **584**, 1374-1378.
- Kourie, J.I. (1998) Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol*, **275**, C1-24.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dolle, P., Cazzalini, O. & Koenig, M. (1997) Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet*, **16**, 345-351.
- Koutnikova, H., Campuzano, V. & Koenig, M. (1998) Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. *Hum Mol Genet*, **7**, 1485-1489.

- Kroemer, G., Marino, G. & Levine, B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, **40**, 280-293.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N. & Andreyev, A. (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J*, **368**, 545-553.
- Kwong, J.Q., Beal, M.F. & Manfredi, G. (2006) The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, **97**, 1659-1675.
- Lee, S., Jeong, S.Y., Lim, W.C., Kim, S., Park, Y.Y., Sun, X., Youle, R.J. & Cho, H. (2007) Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem*, **282**, 22977-22983.
- Lee, S., Park, Y.Y., Kim, S.H., Nguyen, O.T., Yoo, Y.S., Chan, G.K., Sun, X. & Cho, H. (2014) Human mitochondrial Fis1 links to cell cycle regulators at G2/M transition. *Cell Mol Life Sci*, **71**, 711-725.
- Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B.F., Knight, S.A., Camadro, J.M. & Dancis, A. (2003) Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum Mol Genet*, **12**, 879-889.
- Lim, J.H., Lee, H.J., Ho Jung, M. & Song, J. (2009) Coupling mitochondrial dysfunction to endoplasmic reticulum stress response: a molecular mechanism leading to hepatic insulin resistance. *Cell Signal*, **21**, 169-177.
- Liu, H., Nakagawa, T., Kanematsu, T., Uchida, T. & Tsuji, S. (1999) Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J Neurochem*, **72**, 1781-1790.
- Lodi, R., Cooper, J.M., Bradley, J.L., Manners, D., Styles, P., Taylor, D.J. & Schapira, A.H. (1999) Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11492-11495.

- Lopez-Arlandis, J.M., Vilchez, J.J., Palau, F. & Sevilla, T. (1995) Friedreich's ataxia: an epidemiological study in Valencia, Spain, based on consanguinity analysis. *Neuroepidemiology*, **14**, 14-19.
- Lu, C., Schoenfeld, R., Shan, Y., Tsai, H.J., Hammock, B. & Cortopassi, G. (2009) Frataxin deficiency induces Schwann cell inflammation and death. *Biochim Biophys Acta*, **1792**, 1052-1061.
- Luo, L. & O'Leary, D.D. (2005) Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci*, **28**, 127-156.
- Llorens, J.V., Navarro, J.A., Martinez-Sebastian, M.J., Baylies, M.K., Schnewly, S., Botella, J.A. & Molto, M.D. (2007) Causative role of oxidative stress in a Drosophila model of Friedreich ataxia. *FASEB J*, **21**, 333-344.
- Mai, S., Klinkenberg, M., Auburger, G., Bereiter-Hahn, J. & Jendrach, M. (2010) Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J Cell Sci*, **123**, 917-926.
- Marco, A., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F. & Marin, I. (2004) Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol Biol Evol*, **21**, 176-187.
- Mariappan, N., Soorappan, R.N., Haque, M., Sriramula, S. & Francis, J. (2007) TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **293**, H2726-2737.
- Marobbio, C.M., Pisano, I., Porcelli, V., Lasorsa, F.M. & Palmieri, L. (2012) Rapamycin reduces oxidative stress in frataxin-deficient yeast cells. *Mitochondrion*, **12**, 156-161.
- Martyn, C.N. & Hughes, R.A. (1997) Epidemiology of peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **62**, 310-318.

- Meyuhas, O. (2008) Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *Int Rev Cell Mol Biol*, **268**, 1-37.
- Milei, J., Forcada, P., Fraga, C.G., Grana, D.R., Iannelli, G., Chiariello, M., Tritto, I. & Ambrosio, G. (2007) Relationship between oxidative stress, lipid peroxidation, and ultrastructural damage in patients with coronary artery disease undergoing cardioplegic arrest/reperfusion. *Cardiovasc Res*, **73**, 710-719.
- Mincheva-Tasheva, S., Obis, E., Tamarit, J. & Ros, J. (2013) Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-xL protein. *Hum Mol Genet*.
- Miranda, C.J., Santos, M.M., Ohshima, K., Smith, J., Li, L., Bunting, M., Cossee, M., Koenig, M., Sequeiros, J., Kaplan, J. & Pandolfo, M. (2002) Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett*, **512**, 291-297.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. & Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **451**, 1069-1075.
- Monros, E., Molto, M.D., Martinez, F., Canizares, J., Blanca, J., Vilchez, J.J., Prieto, F., de Frutos, R. & Palau, F. (1997) Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *Am J Hum Genet*, **61**, 101-110.
- Montermini, L., Andermann, E., Labuda, M., Richter, A., Pandolfo, M., Cavalcanti, F., Pianese, L., Iodice, L., Farina, G., Monticelli, A., Turano, M., Filla, A., De Michele, G. & Coccozza, S. (1997) The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Hum Mol Genet*, **6**, 1261-1266.
- Montermini, L., Rodius, F., Pianese, L., Molto, M.D., Cossee, M., Campuzano, V., Cavalcanti, F., Monticelli, A., Palau, F., Gyapay, G. & et al. (1995) The Friedreich ataxia critical region spans a 150-kb interval on chromosome 9q13. *Am J Hum Genet*, **57**, 1061-1067.

- Morita, M., Gravel, S.P., Chenard, V., Sikstrom, K., Zheng, L., Alain, T., Gandin, V., Avizonis, D., Arguello, M., Zakaria, C., McLaughlan, S., Nouet, Y., Pause, A., Pollak, M., Gottlieb, E., Larsson, O., St-Pierre, J., Topisirovic, I. & Sonenberg, N. (2013) mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab*, **18**, 698-711.
- Morral, J.A., Davis, A.N., Qian, J., Gelman, B.B. & Koepfen, A.H. (2010) Pathology and pathogenesis of sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol*, **120**, 97-108.
- Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G. & Lill, R. (2002) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet*, **11**, 2025-2036.
- Munoz-Espin, D., Canamero, M., Maraver, A., Gomez-Lopez, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M. & Serrano, M. (2013) Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, **155**, 1104-1118.
- Napoli, E., Morin, D., Bernhardt, R., Buckpitt, A. & Cortopassi, G. (2007) Hemin rescues adrenodoxin, heme a and cytochrome oxidase activity in frataxin-deficient oligodendrogloma cells. *Biochim Biophys Acta*, **1772**, 773-780.
- Niemann, A., Huber, N., Wagner, K.M., Somandin, C., Horn, M., Lebrun-Julien, F., Angst, B., Pereira, J.A., Halfter, H., Welzl, H., Feltri, M.L., Wrabetz, L., Young, P., Wessig, C., Toyka, K.V. & Suter, U. (2014) The Gdap1 knockout mouse mechanistically links redox control to Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*, **137**, 668-682.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A. & Suter, U. (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol*, **170**, 1067-1078.

- Niemann, A., Wagner, K.M., Ruegg, M. & Suter, U. (2009) GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis*, **36**, 509-520.
- Noack, R., Frede, S., Albrecht, P., Henke, N., Pfeiffer, A., Knoll, K., Dehmel, T., Meyer Zu Horste, G., Stettner, M., Kieseier, B.C., Summer, H., Golz, S., Kochanski, A., Wiedau-Pazos, M., Arnold, S., Lewerenz, J. & Methner, A. (2012) Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum Mol Genet*, **21**, 150-162.
- Nunnari, J. & Suomalainen, A. (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, **148**, 1145-1159.
- Oettinghaus, B., Licci, M., Scorrano, L. & Frank, S. (2012) Less than perfect divorces: dysregulated mitochondrial fission and neurodegeneration. *Acta Neuropathol*, **123**, 189-203.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. & Lenaers, G. (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 7743-7746.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**, 609-619.
- Palau, F., De Michele, G., Vilchez, J.J., Pandolfo, M., Monros, E., Coccozza, S., Smeyers, P., Lopez-Arlandis, J., Campanella, G., Di Donato, S. & et al. (1995) Early-onset ataxia with cardiomyopathy and retained tendon reflexes maps to the Friedreich's ataxia locus on chromosome 9q. *Ann Neurol*, **37**, 359-362.
- Palomo, G.M., Cerrato, T., Gargini, R. & Diaz-Nido, J. (2011) Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells. *Hum Mol Genet*, **20**, 2807-2822.

- Pasinelli, P. & Brown, R.H. (2006) Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 710-723.
- Pedrola, L., Espert, A., Valdes-Sanchez, T., Sanchez-Piris, M., Sirkowski, E.E., Scherer, S.S., Farinas, I. & Palau, F. (2008) Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med*, **12**, 679-689.
- Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M.E. & Palau, F. (2005) GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet*, **14**, 1087-1094.
- Perry, S.W., Norman, J.P., Barbieri, J., Brown, E.B. & Gelbard, H.A. (2011) Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*, **50**, 98-115.
- Pizzo, P., Drago, I., Filadi, R. & Pozzan, T. (2012) Mitochondrial Ca²⁺(+) homeostasis: mechanism, role, and tissue specificities. *Pflugers Arch*, **464**, 3-17.
- Pla-Martin, D., Rueda, C.B., Estela, A., Sanchez-Piris, M., Gonzalez-Sanchez, P., Traba, J., de la Fuente, S., Scorrano, L., Renau-Piqueras, J., Alvarez, J., Satrustegui, J. & Palau, F. (2013) Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurobiol Dis*, **55**, 140-151.
- Pla Martín, D. (2012) Fisiopatología celular del déficit de GDAP1, relacionado con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC). Universidad de Valencia.
- Polo, J.M., Calleja, J., Combarros, O. & Berciano, J. (1991) Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study. *Brain*, **114 (Pt 2)**, 855-866.
- Puccio, H., Simon, D., Cossee, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P. & Koenig, M. (2001) Mouse

models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet*, **27**, 181-186.

Radisky, D.C., Babcock, M.C. & Kaplan, J. (1999) The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J Biol Chem*, **274**, 4497-4499.

Rai, M., Soragni, E., Jenssen, K., Burnett, R., Herman, D., Coppola, G., Geschwind, D.H., Gottesfeld, J.M. & Pandolfo, M. (2008) HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model. *PLoS One*, **3**, e1958.

Ranieri, M., Brajkovic, S., Riboldi, G., Ronchi, D., Rizzo, F., Bresolin, N., Corti, S. & Comi, G.P. (2013) Mitochondrial fusion proteins and human diseases. *Neurol Res Int*, **2013**, 293893.

Rao, R.V., Ellerby, H.M. & Bredesen, D.E. (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ*, **11**, 372-380.

Ristow, M., Mulder, H., Pomplun, D., Schulz, T.J., Muller-Schmehl, K., Krause, A., Fex, M., Puccio, H., Muller, J., Isken, F., Spranger, J., Muller-Wieland, D., Magnuson, M.A., Mohlig, M., Koenig, M. & Pfeiffer, A.F. (2003) Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *J Clin Invest*, **112**, 527-534.

Ristow, M., Pfister, M.F., Yee, A.J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C.Y., Ueki, K., Michael, M.D., 2nd, Lowell, B.B. & Kahn, C.R. (2000) Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12239-12243.

Rizzuto, R., Simpson, A.W., Brini, M. & Pozzan, T. (1992) Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, **358**, 325-327.

Rosen, D.R. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **364**, 362.

- Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A. & Rustin, P. (1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet*, **17**, 215-217.
- Ruvinsky, I., Katz, M., Drazan, A., Gielchinsky, Y., Saada, A., Freedman, N., Mishani, E., Zimmerman, G., Kasir, J. & Meyuhas, O. (2009) Mice deficient in ribosomal protein S6 phosphorylation suffer from muscle weakness that reflects a growth defect and energy deficit. *PLoS One*, **4**, e5618.
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovitch-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P. & Meyuhas, O. (2005) Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev*, **19**, 2199-2211.
- Said, G., Marion, M.H., Selva, J. & Jamet, C. (1986) Hypotrophic and dying-back nerve fibers in Friedreich's ataxia. *Neurology*, **36**, 1292-1299.
- Sakamoto, N., Ohshima, K., Montermini, L., Pandolfo, M. & Wells, R.D. (2001) Sticky DNA, a self-associated complex formed at long GAA*TTC repeats in intron 1 of the frataxin gene, inhibits transcription. *J Biol Chem*, **276**, 27171-27177.
- Saraste, A. & Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, **45**, 528-537.
- Saxena, S. & Caroni, P. (2007) Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. *Prog Neurobiol*, **83**, 174-191.
- Schiavi, A., Torgovnick, A., Kell, A., Megalou, E., Castelein, N., Guccini, I., Marzocchella, L., Gelino, S., Hansen, M., Malisan, F., Condo, I., Bei, R., Rea, S.L., Braeckman, B.P., Tavernarakis, N., Testi, R. & Ventura, N. (2013) Autophagy induction extends lifespan and reduces lipid content in response to frataxin silencing in *C. elegans*. *Exp Gerontol*, **48**, 191-201.

- Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A. & Puccio, H. (2008) The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum Mol Genet*, **17**, 3521-3531.
- Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donze, M., Reutenauer, L. & Puccio, H. (2011) Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One*, **6**, e16199.
- Schoenfeld, R.A., Napoli, E., Wong, A., Zhan, S., Reutenauer, L., Morin, D., Buckpitt, A.R., Taroni, F., Lonnerdal, B., Ristow, M., Puccio, H. & Cortopassi, G.A. (2005) Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells. *Hum Mol Genet*, **14**, 3787-3799.
- Senderek, J., Bergmann, C., Ramaekers, V.T., Nelis, E., Bernert, G., Makowski, A., Zuchner, S., De Jonghe, P., Rudnik-Schoneborn, S., Zerres, K. & Schroder, J.M. (2003) Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain*, **126**, 642-649.
- Sevilla, T., Cuesta, A., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., Pedrola, L., Palau, F. & Vilchez, J.J. (2003) Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain*, **126**, 2023-2033.
- Shan, Y., Napoli, E. & Cortopassi, G. (2007) Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. *Hum Mol Genet*, **16**, 929-941.
- Shimizu, Y. & Hendershot, L.M. (2009) Oxidative folding: cellular strategies for dealing with the resultant equimolar production of reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, **11**, 2317-2331.
- Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M. & Puccio, H. (2004) Friedreich ataxia mouse

- models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J Neurosci*, **24**, 1987-1995.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L. & van der Bliek, A.M. (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, **12**, 2245-2256.
- Soragni, E., Herman, D., Dent, S.Y., Gottesfeld, J.M., Wells, R.D. & Napierala, M. (2008) Long intronic GAA*TTC repeats induce epigenetic changes and reporter gene silencing in a molecular model of Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res*, **36**, 6056-6065.
- Soto, I.C., Fontanesi, F., Valledor, M., Horn, D., Singh, R. & Barrientos, A. (2009) Synthesis of cytochrome c oxidase subunit 1 is translationally downregulated in the absence of functional F1F0-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 1776-1786.
- Sparaco, M., Gaeta, L.M., Santorelli, F.M., Passarelli, C., Tozzi, G., Bertini, E., Simonati, A., Scaravilli, F., Taroni, F., Duyckaerts, C., Feleppa, M. & Piemonte, F. (2009) Friedreich's ataxia: oxidative stress and cytoskeletal abnormalities. *J Neurol Sci*, **287**, 111-118.
- Srinivasan, A., Roth, K.A., Sayers, R.O., Shindler, K.S., Wong, A.M., Fritz, L.C. & Tomaselli, K.J. (1998) In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system. *Cell Death Differ*, **5**, 1004-1016.
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J. & Keyes, W.M. (2013) Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, **155**, 1119-1130.
- Sugioka, R., Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. (2004) Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 52726-52734.

- Tanida, I. (2011) Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal*, **14**, 2201-2214.
- Tatsuta, T. & Langer, T. (2008) Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J*, **27**, 306-314.
- Terman, A., Kurz, T., Gustafsson, B. & Brunk, U.T. (2008) The involvement of lysosomes in myocardial aging and disease. *Curr Cardiol Rev*, **4**, 107-115.
- Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E.A. & Brunk, U.T. (2010) Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxid Redox Signal*, **12**, 503-535.
- Thierbach, R., Schulz, T.J., Isken, F., Voigt, A., Mietzner, B., Drewes, G., von Kleist-Retzow, J.C., Wiesner, R.J., Magnuson, M.A., Puccio, H., Pfeiffer, A.F., Steinberg, P. & Ristow, M. (2005) Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet*, **14**, 3857-3864.
- Thomas, P.K. (1970) Peripheral neuropathy. *Br Med J*, **1**, 349-352.
- Traba, J., Del Arco, A., Duchen, M.R., Szabadkai, G. & Satrustegui, J. (2012) SCA_{MC}-1 promotes cancer cell survival by desensitizing mitochondrial permeability transition via ATP/ADP-mediated matrix Ca²⁺ buffering. *Cell Death Differ*, **19**, 650-660.
- Vankan, P. (2013) Prevalence gradients of Friedreich's ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge. *J Neurochem*, **126 Suppl 1**, 11-20.
- Vazquez-Manrique, R.P., Gonzalez-Cabo, P., Ros, S., Aziz, H., Baylis, H.A. & Palau, F. (2006) Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin

increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *FASEB J*, **20**, 172-174.

- Vernia, S., Rubio, T., Heredia, M., Rodriguez de Cordoba, S. & Sanz, P. (2009) Increased endoplasmic reticulum stress and decreased proteasomal function in lafora disease models lacking the phosphatase laforin. *PLoS One*, **4**, e5907.
- Verstreken, P., Ly, C.V., Venken, K.J., Koh, T.W., Zhou, Y. & Bellen, H.J. (2005) Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron*, **47**, 365-378.
- Vijayvergiya, C., Beal, M.F., Buck, J. & Manfredi, G. (2005) Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci*, **25**, 2463-2470.
- Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Pevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W. & Milligan, C. (2013a) Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav*, **3**, 335-350.
- Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Pevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W. & Milligan, C. (2013b) Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav*, **3**, 431-457.
- Wagner, K.M., Ruegg, M., Niemann, A. & Suter, U. (2009) Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One*, **4**, e5160.
- Wallace, D.C. (1982) Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol Rev*, **46**, 208-240.
- Wang, C.X., Song, J.H., Song, D.K., Yong, V.W., Shuaib, A. & Hao, C. (2006) Cyclin-dependent kinase-5 prevents neuronal apoptosis

- through ERK-mediated upregulation of Bcl-2. *Cell Death Differ*, **13**, 1203-1212.
- Wen, Y.D., Wang, H., Kho, S.H., Rinkiko, S., Sheng, X., Shen, H.M. & Zhu, Y.Z. (2013) Hydrogen sulfide protects HUVECs against hydrogen peroxide induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *PLoS One*, **8**, e53147.
- Wilson, R.B. & Roof, D.M. (1997) Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat Genet*, **16**, 352-357.
- Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F. & Cortopassi, G. (1999) The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet*, **8**, 425-430.
- Yandim, C., Natisvili, T. & Festenstein, R. (2013) Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *J Neurochem*, **126 Suppl 1**, 21-42.
- Yang, E. & Korsmeyer, S.J. (1996) Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, **88**, 386-401.
- Yang, Z. & Klionsky, D.J. (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **22**, 124-131.
- Yoon, T. & Cowan, J.A. (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc*, **125**, 6078-6084.
- Yoon, T. & Cowan, J.A. (2004) Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem*, **279**, 25943-25946.
- Zanella, I., Derosas, M., Corrado, M., Cocco, E., Cavadini, P., Biasiotto, G., Poli, M., Verardi, R. & Arosio, P. (2008) The effects of frataxin silencing in HeLa cells are rescued by the expression of human mitochondrial ferritin. *Biochim Biophys Acta*, **1782**, 90-98.

- Zarse, K., Schulz, T.J., Birringer, M. & Ristow, M. (2007) Impaired respiration is positively correlated with decreased life span in *Caenorhabditis elegans* models of Friedreich Ataxia. *FASEB J*, **21**, 1271-1275.
- Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D.M. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 21-35.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M. & Vance, J.M. (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*, **36**, 449-451.

