

UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula



FISIÓN MITOCONDRIAL EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DEL CARDIOMIOCITO

Profesor Patrocinante:

Dr. Sergio Lavandero G.
Depto. Bioquímica y Biología
Molecular, FONDAP CEMC,
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas,
Universidad de Chile

Directores de tesis:

Dr. Sergio Lavandero G.
Dra. Verónica Eisner S.
Depto. Bioquímica y Biología
Molecular, FONDAP CEMC,
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas,
Universidad de Chile

Memoria para optar al título de Bioquímico
VALENTINA MARÍA PARRA ORTIZ
Santiago, 2006

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	2
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
SUMMARY	10
INTRODUCCIÓN	12 12
1.3. La maquinaria de la fisión mitocondrial 1.4. Muerte celular 1.4.1. Fisión mitocondrial y apoptosis 1.4.2. Fisión mitocondrial y autofagia 1.5. Ceramidas y muerte.	16 18 18
2. HIPÓTESIS	24
3. OBJETIVO GENERAL	24
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.3. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata	26 26
5.7. Preparación de fracciones citosólicas y mitocondriales	27 28
5.10. Western blot	28 29 30
5.13. Determinación del potencial mitocondrial de membrana 5.14. Determinación del volumen mitocondrial 5.15. Análisis digital de las imágenes 5.16. Análisis estadístico	31 32

RESULTADOS 6.1. Expresión de las proteínas de la fisión mitocondrial en cardiomiocitos	
6.2. Caracterización de la morfología mitocondrial normal y la que se	
induce tras el tratamiento con C ₂ -ceramida	35
6.3. Efecto de C ₂ -ceramida en la distribución subcelular de las proteínas de	
la fisión mitocondrial	38
6.4. Efectos de la disminución de los niveles de Mfn-2 mediante un	
adenovirus antisentido	41
6.5. Efectos de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre los cambios	
en la morfología y maquinaría mitocondrial inducidos por C ₂ -ceramida en el	
cardiomiocito	
6.6. C ₂ -ceramidas y apoptosis	
6.7. C ₂ -ceramidas y autofagia.	
6.8. C ₂ -ceramidas y viabilidad celular	55
apotóticos tempranos inducidos por C_2 -ceramida en el cardiomiocito	57
	51
7. DISCUSIÓN	60
7.1. La maquinaria de la fisión mitocondrial en el cardiomiocito	
7.2. Ceramidas y fisión mitocondrial	
7.3. Efectos de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre la fisión	
mitocondrial	62
7.4. Fisión mitocondrial y muerte celular	64
7.5. Perspectivas en el estudio de la fisión/fusión mitocondrial	68
8. CONCLUSIONES	69
9. BIBLIOGRAFÍA	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dinámica de la red mitocondrial en células mamíferas	15
Figura 2. Modelos de fisión mitocondrial.	17
Figura 3. Fisión mitocondrial y su relación temporal con la apoptosis	20
Figura 4. Expresión de Drp-1 y Fis-1 en cardiomiocitos en cultivo y células Hela.	34
Figura 5. Efecto de la concentración de C ₂ -ceramida en la morfología mitocondrial del cardiomiocito.	36
Figura 6. Efecto del tiempo de exposición a C ₂ -ceramida sobre la morfología mitocondrial de cardiomiocito	37
Figura 7. Efecto de C ₂ -ceramida sobre la distribución subcelular de Drp-1 y Fis-1 en el cardiomiocito	39
Figura 8. Efecto de C ₂ -ceramida en los niveles de Drp-1 y Fis-1 en fracciones mitocondriales y citosólicas de cardiomiocitos.	40
Figura 9. Disminución de los niveles de Mfn-2 mediante un adenovirus antisentido.	43
Figura 10. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito en cultivo.	44
Figura 11. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre la distribución subcelular de Drp-1 y Fis-1 en el cardiomiocito en cultivo	45
Figura 12. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre la morfología mitocondrial inducida por C ₂ -ceramida en el cardiomiocito	47
Figura 13. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre los cambios en la distribución subcelular de Drp-1 y Fis-1 inducida por C ₂ -ceramida en el cardiomiocito.	49
Figura 14. Efecto de C ₂ -ceramida sobre el potencial de membrana mitocondrial en el cardiomiocito.	51
Figura 15. Efecto de C ₂ -ceramida sobre la salida del citocromo C desde la mitocondria del cardiomiocito.	52
Figura 16. Efecto de C ₂ -ceramida sobre la colocalización de mitocondrias con vacuolas autofágicas.	54

Figura 17. Efecto de C ₂ -ceramida en la viabilidad del cardiomiocito	
or our diofficonomic	00
Figura 19. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 en la salida del citocromo C estimulada por C ₂ -ceramida desde la mitocondria del cardiomiocito.	59
Figura 20. Modelo del mecanismo de activación de la fisión mitocondrial durante la apoptosis y su relación con la pérdida del potencial	
mitocondrial de membrana (ψmt)	67

ABREVIATURAS

AdAsMfn-2 : Adenovirus antisentido Mfn-2

AdGFP : Adenovirus GFP
AdLC3-GFP : Adenovirus LC3-GFP
AdVac : Adenovirus vacío

AIF : Proteína factor inductor de la apoptosis

APS : Persulfato de amonio

Apaf-1 : Factor apotótico activador de proteasas tipo 1

ATP : Adenosín trifosfato

Bak : Proteína reguladora de la apoptosis Bax : Proteína reguladora de la apoptosis

C₂-ceramida : N-acetil-D-esfingosina

Ca⁺² : Ión calcio

CaCl : Cloruro de calcio

Caf4p : Proteína de la fisión mitocondrial en levaduras

CCCP : Carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona

DH-C₂ : Dihidroceramida DMSO : Dimetil sulfóxido

DNA : Ácido desoxirribonucleico

Dnm1p : Proteína hortóloga de levaduras de Drp-1

Drp-1 : Proteína relacionada a la familia de las dinaminas tipo-1

Drp*K*38*A* : Mutante en sitio GTPásico de Drp-1 EDTA : Ácido etilendiaminotetraacético

FBS : Suero fetal de bovino FC : Fosfatidilcolina FCS : Suero fetal de cabra

Fis-1 : Proteína de la fisión mitocondrial en mamíferos FZO : Proteína hortóloga de levaduras de Mfn 1-2

GTP : Guanosín trifosfato

h : Horas

Hank's : Solución salina balanceada

kDa : Kilo dalton

Mdv1p : Proteína de la fisón mitocondrial en levaduras

Mfn1-2 : Proteína Mitofusina 1-2 MgCl₂ : Cloruro de magnesio

Mgm1p : Proteína hortóloga de levaduras de OPA-1

Min : Minutos ml : Millitro mM : Millimolar

mtHSP-70 : Proteína heat schok -70 de la mitocondria

MOI : Multiplicidad de infección viral

NaCl : Cloruro de Sodio

NADPH : Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido

NaOH : Hidroxido de sodio nm : Nanómetros NO : Óxido nítrico

OPA-1 : Proteína de la atrofia óptica tipo-1

PARL : Proteasa asociada a prenisilina tipo romboidea

PBS : Tampón fosfato salino
PI : Yoduro de propidio
PKC : Proteína quinasa C
PMSF : p-fenilmetilsulfonilfluoruro

RNA : Ácido ribonucleico
RNAi : RNA de interferencia
ROI : Región óptica de interés

ROS : Especies reactivas del oxígeno rpm : Revoluciones por minuto SDS : Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE : Gel de poliacrilamida desnaturante

SEM : Error estándar de la media

SMasa : Esfingomielinasa
TBS : Tampón tris salino
TCA : Ácido tricloro acético

TEMED : N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
TMRM : Tetrametilrodamina metil éster
Tris : Tris-(hidroximetil)-aminoetano
v/v : Porcentaje volumen-volumen

μg : Microgramo

Ugo1p : Proteína de la fusión mitocondrial en levaduras

μl : Microlitro μM : Micromolar μm : Micrómetro

RESUMEN

Las mitocondrias son estructuras fundamentales en la fisiología de las células eucariontes dado que ellas participan en una amplia gama de procesos, entre los que se incluyen la generación de energía, metabolismo del Ca⁺² y la regulación de la muerte celular. Tanto el corazón, ellas cumplen un papel vital tanto en su metabolismo como función contráctil.

La red mitocondrial experimenta cambios dinámicos en su estructura, transitando por un delicado equilibrio de procesos de fusión y fisión, siendo cada uno de estos eventos mediados por las GTPasas Fis-1 y Drp-1. Fis-1 se encuentra difusamente asociada a la membrana mitocondrial externa (MME). En cambio, Drp-1 migra desde el citoplasma a zonas puntuales de la MME durante el proceso de fisión. La pérdida del balance entre los procesos de fisión y fusión se asocia a alteraciones en la función mitocondrial y ciertas condiciones patológicas. A nivel celular, la fisión mitocondrial se ha relacionado con la muerte celular por apoptosis, la cual depende a su vez del estímulo utilizado. La pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial y fragmentación de estos organelos ocurren durante la apoptosis, eventos que tienen lugar concomitantemente con la activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 y caspasas, Sin embargo, existen algunos modelos donde la fisión de la red mitocondrial no se presenta durante el proceso de muerte.

La maquinaria de la fisión mitocondrial no ha sido estudiada en cardiomiocitos bajo condiciones de integridad de la red mitocondrial. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar los cambios inducidos en las proteínas Fis-1 y Drp-1 al desencadenar la fragmentación de la red mitocondrial por ceramidas en cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas. Los resultados mostraron que Drp-1 y Fis-1 están presentes en cardiomiocitos y con características similares a otros modelos celulares. C₂-ceramida desencadenó un descenso rápido en el potencial mitocondrial de membrana, fragmentación de la red de estos organelos en forma dependiente del tiempo y concentración de C₂-ceramida y modificación del patrón de distribución y expresión de las proteínas Drp-1 y Fis-1 alcanzando un 20% de

colocalización. La exposición de los cardiomiocitos por 6 h con C_2 -ceramida 40 μ M gatilló la salida del citocromo C de la mitocondria al citosol y produjo un 35% de muerte. La disminución de los niveles de mitofusina-2 mediante sobrexpresión de un adenovirus antisentido contra la proteína de la fusión mitocondrial Mfn-2 (AsMfn-2) cambió por si sola la morfología mitocondrial, el patrón de distribución de Drp-1 y Fis-1 y alteró las cinéticas de caída del potencial de membrana mitocondrial, pero no la salida del citocromo C desencadenadas por C_2 -ceramida.

En conclusión, los resultados indican que los componentes de la maquinaria de la fisión mitocondrial se encuentran presentes en cardiomiocitos y que C₂-ceramida gatilla su muerte por medio un proceso apoptótico que involucra la disrupción y fisión de la red mitocondrial.

SUMMARY

Mitochondrial fission in the program cell death of cardiomyocytes

Cardiac metabolism and physiological function are supported by mitochondria activity. They are main players in the physiology of eukaryotes; they provide a myriad of services to the cell, including energy production, Ca⁺² buffering and regulation of apoptosis. Mitochondria undergo regulated fusion and fission and each of these events are mediated by GTPase protein complexes such as Fis-1 and the dynamin-related protein Drp-1. Fis-1 is diffusely located throughout the outer mitochondrial membrane (OMM) and recruit Drp-1 from the cytoplasm to punctuate foci on the OMM during the fission process.

The loss of balance between fusion and fission events has been associated with mitochondria loss of function and pathological conditions. At cellular level, mitochondria fission has been associated with apoptotic cell death in a stimulus dependent manner. Loss of mitochondria integrity and activation of fission proteins occurred concomitant with proapoptotic Bcl-2 and caspase cascade activation, even when there are some models where mitochondria fission is not present in the apoptotic process.

Mitochondria fission machinery has not been studied in cardiomyocytes under loss of mitochondria network integrity conditions. We evaluated here Fis-1 and Drp-1 changes when we induce mitochondrial network fragmentation by ceramides treatment in cultures neonatal cardiomyocytes. The main findings of this work was that Drp-1 and Fis-1 are present in cardiomyocytes with similar distribution pattern that other cell types. C_2 -ceramides promoted a rapid decrease in mitochondrial membrane potential, mitochondria network fragmentation in a dose and time dependent manner with both Drp-1 and Fis1 modification of expression and distribution pattern reaching a 20% of colocalization between both proteins. We also found that the exposure of cardiac myoctes for 6 h to C_2 -ceramide 40 μ M induced the release of cytocrome C from mitochondria to cytosol and triggered 35% death. The overexpression of AsMfn-2 (mitofusin-2 antisense, a mitochondrial fusion inhibitor) changed mitochondrial cardiomyocyte morphology, the distribution pattern

of Drp-1 and Fis-1 and altered the kinetic of the decrease in mitochondrial membrane potential, but not the release of citocromce C promoted by C_2 -ceramide.

In conclusion, the results indicate that the components of fission mitochondrial machinery are in cardiomyocytes and C₂-ceramide triggers their death by an apoptotic process that invloves the disruption and fission of the mitochondrial network.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fusión y fisión mitocondriales

Las mitocondrias juegan un papel esencial en la mantención de la homeostasis metabólica de las células eucariontes, proveyendo de abundante energía que se genera a través de la fosforilación oxidativa. Además son el compartimiento para numerosas reacciones esenciales en el metabolismo y juegan un papel importante en la muerte y envejecimiento celular (Shcheffler, 2001). Las mitocondrias corresponden a organelos complejos, rodeados por una doble membrana, con una morfología y distribución intracelular característica para cada tipo celular. En las fotografías clásicas de microscopía electrónica aparecen como organelos individuales, debido a que estas imágenes muestran sólo una sección individual a través de las células. Sin embargo, esta visión está sobresimplificada dado que las mitocondrias constituyen un retículo mitocondrial, es decir una red interconectada y altamente dinámica, mantenida por eventos permanentes, opuestos y balanceados de fusión y fisión (Westerman, 2002).

1.1.1. Papel celular de la fusión y fisión mitocondrial

La división o fisión mitocondrial es esencial para la morfología y distribución de las mitocondrias. Este proceso juega un papel fundamental en la división celular, donde las mitocondrias deben distribuirse entre las células madre e hija (Rube and van der Bliek, 2004). Sin embargo, la fisión mitocondrial no sólo ocurre en este último evento, sino a lo largo de toda la vida de la célula. Actualmente, sabemos muy poco de los mecanismos que regulan la división mitocondrial en las diferentes etapas del ciclo celular, aunque recientemente se ha demostrado que la masa de mitocondrias aumenta entre el final de la fase S e inicio de la fase M (Sanger et al., 2000). Sin embargo, la función que la división juega en el aumento o disminución de la masa mitocondrial está aún lejos de ser caracterizado y un desafío científico interesante será la identificación de las señales de transducción que regulan la velocidad de división mitocondrial (Rube and van der Bliek, 2004).

Hay variados antecedentes en la literatura que muestran la fisión mitocondrial asociada a otros procesos distintos al ciclo celular. En la célula muscular, tanto

señales celulares como ambientales pueden desencadenar en forma directa la división mitocondrial; por ejemplo, se ha observado que las mitocondrias de éstas células son capaces de proliferar durante la biogénesis, pero también tras el ejercicio (Brunk, 1981; Moyes et al., 1997). En otros tipos celulares, la división mitocondrial puede ser inducida por un amplio espectro de compuestos, entre los que se cuentan a las benzodiazepinas, inhibidores de la fosforilación oxidativa, ésteres de forbol, entre otros (Vorobjev and Zorov, 1983; Muller-Hocker et al., 1986; Kawara et al., 1991). Finalmente, en vertebrados, el número de mitocondrias puede ser controlado adicionalmente por la hormona tiroídea, la cual se relaciona con la tasa metabólica (Goglia et al., 1999). En resumen, parece existir una amplia variedad de estímulos y vías que regulan la fisión mitocondrial pero que cuyos detalles mecanísticos aún permanecen desconocidos.

El proceso de fisión es compensado con el proceso opuesto denominado fusión mitocondrial, el cual ayuda a mantener un número relativamente constante de mitocondrias. Cuando la fusión mitocondrial predomina, las mitocondrias se tornan altamente interconectadas, formando una red estructurada (Labrousse et al., 1999; Sesaki and Jensen, 1999; Smirnova et al., 2001). El establecimiento y la mantención de un continuo mitocondrial intracelular mediante los procesos de fusión y fisión, ayuda a la disipación de la energía en toda la célula; en la forma de potenciales de membrana o de iones, tal es el caso del calcio. En los eucariontes, también ha sido descrito el proceso de complementación de productos génicos mitocondriales en mitocondrias fusionadas. El DNA mitocondrial usualmente acumula mutaciones puntuales, lo cual llevaría a la inactividad si las mitocondrias se encontrasen aisladas unas de otras (Ono et al., 2001; Hermann et al., 1998). En general, la fusión mitocondrial es un proceso que mantiene la morfología e integridad del retículo mitocondrial y protegiendo el material genético de este organelo.

1.2. La maquinaria de la fusión mitocondrial

Las proteínas Mitofusina 1, 2 (Mfn-1, Mfn-2) y OPA-1 son esenciales en el proceso de fusión mitocondrial (Chen et al., 2003; Eura et al., 2003; Ishihara et al., 2003; Cipolat et al., 2004; Chen et al., 2005a) y corresponden a grandes GTPasas localizadas en la mitocondria. Mfn-1 y Mfn-2 comparten un 81% de homología y

topologías similares (Santel et al., 2001; Legros et al., 2002; Rojo et al., 2002; Chen et al., 2003; Santel and Fuller, 2003). Ambas residen en la membrana externa de la mitocondria y su estructura posee dos dominios, uno amino-terminal con actividad GTPásica, relacionada con la familia de las dinaminas, y otro carboxilo-terminal homólogo a la proteína Fzo de levadura (Jaroszewski and Godzik, 2002; Rojo et al., 2002). OPA-1 otra de las proteínas implicadas en la fusión mitocondrial, también corresponde a una GTPasa. Su estructura ha revelado una secuencia de destinación mitocondrial en el dominio amino-terminal, un dominio transmembrana, un dominio central GTPásico relacionado con la familia de las dinaminas y un dominio C-terminal helicoidal (Jaroszewski and Godzik, 2002; Bossy-Wetzel et al., 2003). OPA-1 es una proteína del espacio transmembrana, asociada íntimamente al espacio interno de la mitocondria (Olichon et al., 2002). Sin embargo, existen al menos 8 isoformas generadas por splicing alternativo (Delettre et al., 2001), algunas de las cuales muestran localizaciones diferencial. Mgm1p, una proteína ortóloga a OPA-1 de levadura, se genera como una proteína integral de la membrana interna mitocondrial, pero que se transforma en una proteína soluble del espacio intermembrana por medio de diferentes cortes proteolíticos (Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003), siendo ambas formas de Mgm1p necesarias para su funcionalidad (Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003, Herlan et al., 2004). Estas modificaciones post-transduccionales no han sido demostradas aún en mamíferos, pero la proteasa de mamíferos PARL es una candidata potencial (McQuibban et al., 2003).

Presumiblemente, ambas Mfns y OPA-1 actúan en forma conjunta, promoviendo la fusión mitocondrial. En concordancia con esta idea, se ha demostrado que OPA-1 estimula la tubulación mitocondrial, un proceso que sería dependiente de Mfn-1 (Cipolat et al., 2004). Mfn-1 y Mfn-2 homo o heterodimerizan (Chen et al., 2003), pero aún no se ha demostrado una interacción directa entre Mfns y OPA-1 en células mamíferas. En levaduras, los estudios de inmunoprecipitación han mostrado asociaciones débiles, pero reproducibles entre Fzo1 y Mgm1p (Wong et al., 2001; Sesaki et al., 2003) y adicionalmente Ugo1p, otra proteína necesaria para la fusión, interactúa con este complejo, pero aún no se ha encontrado aún ningún homólogo de esta proteína en mamíferos (Chen and Chan, 2005b) (Ver Figura 1A).

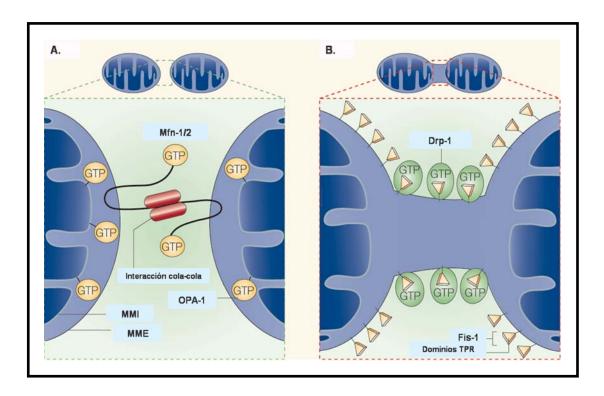


Figura 1. Dinámica de la red mitocondrial en células mamíferas.

(A) En la fusión mitocondrial, dos mitocondrias se acoplan a través de las proteínas Mfn-1 y 2 por interacciones de los dominios cola-cola de ambas proteínas, las cuales se encuentran localizadas en la membrana externa mitocondrial (MME). Posteriormente, la proteína OPA-1, parcialmente anclada a la membrana interna mitocondrial, es la encargada de llevar a cabo en forma activa el proceso de fusión mitocondrial. (B) Durante la fisión, la proteína Fis-1 recluta a la GTPasa Drp-1 (dynamin-related protein 1) a través de sus dominios TPR, a sitios definidos de la membrana mitocondrial externa.

La existencia de dos Mfns, complica aún más el cuadro de la regulación de la fusión mitocondrial en mamíferos. Ambas proteínas están presentes y se expresan en algunos de los mismos tipos celulares (Meeusen and Nunnari, 2005). Aunque existen evidencias que sugieren que cada isoforma tiene distintas funciones *in vivo*, ambas se requerirían para sostener niveles basales de fusión mitocondrial (Chen et al., 2003). Mfn-1 posee mayor actividad GTPásica que Mfn-2. Sin embargo, esta actividad de Mfn-1 depende de GTP, no así Mfn-2 (Ishihara et al., 2004). Los niveles relativos de expresión de Mfn-1 y 2 varían de acuerdo al tipo celular; Mfn-1 predomina en el cerebro, mientras que Mfn-2 lo hace en el corazón y testículos (Eura et al., 2003; Santel et al., 2003). Por lo tanto, los niveles de Mfn-1 y 2 participarían en la regulación de la competencia de la fusión mitocondrial en un tipo celular dado. Las diferencias en la expresión de la maquinaria de la fusión mitocondrial afectarían el balance de la dinámica mitocondrial, explicando el amplio

espectro de morfologías mitocondrial observadas en los diferentes tipos celulares de mamíferos (Meeusen and Nunnari, 2005).

1.3. La maquinaria de la fisión mitocondrial

La fisión mitocondrial en las células mamíferas está regulada por una proteína GTPasa relacionada con la familia de las dinaminas (Drp-1). La secuencia aminoacídica de Drp-1 comparte una similitud importante con las dinaminas, las cuales son grandes GTPasas que regulan el tráfico vesicular y la endocitosis. La función molecular precisa de las dinaminas y de Drp-1 no ha sido aún completamente aclarada, sin embargo, se han propuesto dos modelos (Bossy-Wetzel et al., 2003). El primer modelo postula que las dinaminas y Drp-1 actúan como mecanoenzimas, participando activamente en la constricción de la membrana y corte. Esta idea se basa en la observación que dinaminas purificadas oligomerizan en anillos y que, tras la adición de GTP, causan la constricción de túbulos lipídicos in vitro. En forma similar a las dinaminas, Drp-1 forma complejos oligoméricos espirales in vitro (Labrousse et al., 1999; Hinshaw, 2000), lo que ha llevado a proponer que Drp-1 acoplaría la hidrólisis de GTP a la constricción de la membrana mitocondrial y fisión (Smirnova et al., 2001). El segundo modelo propone que las dinaminas y Drp-1 no actuarían como GTPasas generadoras de fuerza, sino como GTPasas regulatorias que reclutarían y activarían sistemas efectores que mediarían la curvatura de la membrana y fisión. Posibles efectores en esta vía, incluyen a las endofilinas y a proteínas relacionadas (Ringstad et al., 1999; Schmidt et al., 1999; Smirvova et al., 2001). Trabajos recientes, indican que endofilina B1 (también llamada Bif-1 y SH3GLB1), integrante de una familia de proteínas involucradas en la formación de vesículas endocíticas, participaría río abajo de Drp-1 en el proceso de fisión mitocondrial (Karbowski et al., 2004a). Este trabajo ha señalado una nueva conexión, aparte de la homología de Drp-1 con la familia de las dinaminas, entre el proceso de división mitocondrial y el transporte vesicular. Aún es incierto si endofilina B1 se une directamente a Drp-1, sin embargo se requiere para el proceso de fisión mitocondrial. En este modelo, Drp-1 mediaría la fisión a través de la remoción de membrana en la forma de pequeñas vesículas desde la membrana mitocondrial externa en el plano de los futuros sitios de corte (Youle and Karbowski, 2005) (Ver Figura 2).

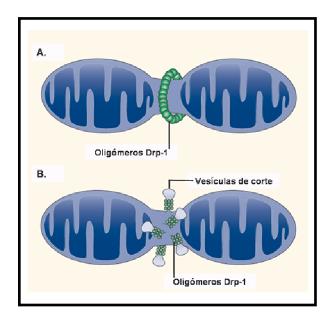


Figura 2. Modelos de fisión mitocondrial.

(A) En el primer modelo, Drp-1 participaría directamente en la constricción y corte de la membrana mitocondrial mediante oligomerización en forma de anillo alrededor de ésta. (B) En el segundo modelo, Drp-1 mediaría el corte a partir de puntos focales definidos en la membrana mitocondrial, reclutando otros efectores como endofilina B1.

Drp-1 reside normalmente en el citoplasma, pero también se acumula en fosas de la membrana externa mitocondrial que representan futuros sitios de fisión. Drp-1 carece de una secuencia de destinación mitocondrial y por ello sería reclutada a la membrana por medio de Fis-1, una pequeña proteína que actuaría como un adaptador en el ensamblaje de complejos de fisión de alta masa molecular (Bossy-Wetzel et al., 2003). Sin embargo, la reducción de los niveles de Fis-1 mediante RNA de interferencia (RNAi) no interfiere con la localización de Drp-1 hacia la mitocondria (Lee et al., 2004). Actualmente sólo se ha demostrado una leve, pero directa interacción entre Fis-1 y Drp-1 con proteínas recombinantes, pero esta asociación aún no se ha demostrado in vivo (Yoon et al., 2003). En contraste, en levaduras mutantes para fis-1, la localización mitocondrial de Dnm1p (ortóloga de Drp-1) se pierde completamente. Fis1p recluta a Dnm1p hacia la mitocondria a través de dos adaptadores moleculares, Mdv1p o Caf4p (Griffin et al., 2005). Adicionalmente otra proteína, Mdv1p, juega también un papel en la activación postreclutamiento de Dnm1p (Tieu et al., 2002; Cerveny and Jensen, 2003; Griffin et al., 2005) (Ver Figura 1B).

1.4. Muerte celular

Los procesos de muerte celular pueden ser divididos en dos grandes procesos, apoptosis y necrosis. Bioquímicamente la apoptosis se define como un proceso regulado genéticamente y dependiente de energía, en el que la propia célula decide y ejecuta su autodestrucción, conduciendo a una eliminación selectiva, sin daño a las células vecinas (Daniel and Korsmeyer, 2004). Este proceso también se caracteriza por disminución del volumen celular y formación de "cuerpos apoptóticos", manteniendo la integridad de la membrana plasmática y evitando así el vaciamiento del contenido intracelular y desarrollo de un proceso inflamatorio (Maldonado et al., 2001; Edinger and Thompson, 2004). En contraste con la apoptosis, la necrosis es el resultado final de una catástrofe bioenergética que resulta de la depleción intracelular de ATP hasta un nivel incompatible con la sobrevivencia celular y que se inicia por noxas tóxicas o físicas (Edinger and Thompson, 2004).

En los últimos años hay evidencias de que las células se suicidan por mecanismos diferentes a la apoptosis, surgiendo nuevos conceptos como el de autofagia (Jaattela and Tschopp, 2003; Lockshin and Zakeri, 2004). Autofagia, significa literalmente, comerse a si mismo, y corresponde a una estrategia conservada a través de la evolución. Las células encienden este programa inicialmente de sobrevivencia, gatillando la degradación de constituyentes celulares para la producción de energía en períodos de estrés nutricional (Levine and Klionsky, 2004). Brevemente, en este proceso vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, formadas en el citosol, encapsulan citoplasma y organelos completos. Posteriormente este autofagosoma se fusiona con el lisosoma, donde los contenidos son reciclados y degradados. Se ha sugerido que las células que mueren por este mecanismo, se digieren hasta un punto en donde la situación es irreversible, activándose así la muerte celular (Baehrecke, 2003; Gozuacik and Kimchi, 2004).

1.4.1. Fisión mitocondrial y apoptosis

Las mitocondrias juegan un papel central en el inicio y ejecución de la apoptosis y otras formas de muerte celular. La disfunción mitocondrial en la muerte celular se caracteriza por un declive en el potencial mitocondrial de membrana, defectos en la

respiración celular, incremento en la producción de ROS, cambios en los niveles de ATP y liberación de factores apoptogénicos, incluyendo al citocromo C y AIF (Bossy-Wetzel et al., 2003).

Diferentes estudios han demostrado que la morfología mitocondrial cambia durante la apoptosis, dando como resultado mitocondrias pequeñas, esféricas y más numerosas (Mancini et al., 1997; Desagher and Martinou, 2000; Frank et al., 2001; Pinton et al., 2001; Jagasia et al., 2005). Este proceso de fragmentación sucede en la etapa temprana de la vía apoptótica, durante el mismo espacio temporal en que proteínas pro-apotóticas Bax y Bak se translocan desde el citosol a la mitocondria, pero previo a la activación de las caspasas (Chan, 2006; Youle and Karbowski, 2005; Frank et al., 2001; Capano and Crompton, 2002; Karbowski et al., 2004b). Drp-1 (Frank et al., 2001; Breckenridge et al., 2003; Sugioka et al., 2004) y endofilina B1 (Karbowski et al., 2004a) también se traslocan desde el citosol a fosas definidas de la membrana mitocondrial en la fase temprana del proceso de muerte y se cree que probablemente mediarían la fisión mitocondrial apoptótica. El bloqueo de la actividad de Drp-1, antes de la inducción de la apoptosis, no sólo inhibe la fisión mitocondrial, sino también retrasa la activación de las caspasas (Frank et al., 2001; Karbowski et al., 2002; Breckenridge et al., 2003; Sugioka et al., 2004). Por otra parte, la inhibición de Fis-1, la que también es requerida para la fisión, iqualmente causa la inhibición de la apoptosis, mientras que su sobreexpresión induce muerte celular (James et al., 2003). Consistente con estos resultados, la inducción de la fusión mitocondrial por sobrexpresión de Mfn-1 o Mfn-2 inhibe el proceso apoptótico (Sugioka et al., 2004) así como la disminución de los niveles de OPA-1, que también resultan en fisión mitocondrial, liberación espontánea del citocromo C y apoptosis (Olichon et al., 2003).

Una conexión directa entre la maquinaria de la fisión mitocondrial y la apoptosis ha surgido del análisis de la localización subcelular de Bax y Bak, estas proteínas se reclutan en fosas específicas de la membrana externa mitocondrial en las primeras etapas de la apoptosis (Nechushtan et al., 2001; Valetijn et al., 2003). Estas fosas, a su vez, también colocalizan con Drp-1 y Mfn-2 en los futuros sitios de fisión y apoyan la idea de que Bax y Bak participarían en el proceso de corte y división de la mitocondria. Por otra parte, el citocromo C se libera desde la

mitocondria en los mismos 15 min en que Bax coalesce en la membrana externa mitocondrial (Karbowski et al., 2004b). La inhibición de Drp-1 mediante un dominante negativo (Drp-1*K38A*), no sólo inhibe la fragmentación mitocondrial durante la apoptosis, sino también inhibe la liberación del citocromo C (Lee et al., 2004; Frank et al., 2001; Breckenridge et al., 2003; Germain et al., 2005) (<u>Ver Figura 3</u>).

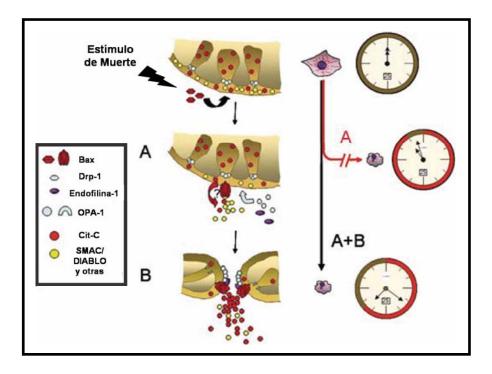


Figura 3. Fisión mitocondrial y su relación temporal con la apoptosis.

Panel izquierdo. Tras la inducción de la apoptosis, Bax se transloca a la membrana mitocondrial externa y oligomeriza en los futuros sitios de fisión, causando una disminución del potencial mitocondrial. Al mismo tiempo, Drp-1 se recluta hacia la mitocondria, desencadenando el proceso de fisión e inactivando a OPA-1 y estimulando la liberación del citocromo C y otras proteínas intramitocondriales. Panel derecho. Cuando la liberación del citocromo C se completa, la célula muere rápidamente (flecha negra). La inhibición de la fisión mitocondrial previene la liberación del citocromo C y la activación de las caspasas se retarda (flecha roja).

La forma en que Bax y Bak estarían participando con Drp-1 y endofilina B1 aún se desconoce. En el citosol de células normales, la proteína Bax es monomérica y no está asociada a endofilina B1. Sin embargo durante la apoptosis, Bax experimenta cambios conformacionales que podrían llevarla a interactuar con endofilina B1. Bax y endofilina B1 se traslocan desde el citosol a la mitocondria al mismo tiempo, quizás como un complejo (Youle and Karbowski, 2005). Estudios *in vitro* han mostrado que endofilina B1 curva membranas (Farsad et al., 2001) y Bax,

a su vez, se inserta selectivamente en vesículas curvadas (Basanez et al., 2002), lo que ha llevado a especular que endofilina B1 promovería la inserción de Bax en la membrana externa mitocondrial a través de su actividad de deformación de membranas biológicas (Youle and Karbowski, 2005).

1.4.2. Fisión mitocondrial y autofagia

No existe una relación tan clara entre fisión mitocondrial y autofagia. La autofagia en una célula joven normal, es eficiente para degradar estructuras biológicas dañadas, tales como mitocondrias y proteínas citosólicas. La fisión mitocondrial a su vez, previene la acumulación de mitocondrias gigantes, las que posteriormente, sufrirían procesos de recambio mediante autofagia (Cuervo et al., 2005). Estudios en cultivos de cardiomiocitos senescentes han mostrado la acumulación de mitocondrias defectuosas y de gran tamaño, lo que se ha relacionado con la pérdida de funcionalidad mitocondrial y un aumento de las especies reactivas del oxígeno (Terman et al., 2003; Terman et al., 2004). Estos resultados sugieren que estas células podrían experimentar un proceso autofágico imperfecto y/o una insuficiente degradación lisosomal de las mitocondrias dañadas. A su vez, el aumento del tamaño podría estar asociado a un proceso de fisión imperfecto, debido al daño oxidativo sufrido por las mitocondrias. Estas ideas se basan en la que la inhibición farmacológica de la autofagia con 3-metiladenina sólo induce una acumulación moderada de mitocondrias grandes y, probablemente, senescentes; pero incrementa drásticamente la acumulación de mitocondrias pequeñas, reflejo de una mayor tasa de recambio (Terman et al., 2003; Terman et al., 2004).

Barsoum et al. han descrito recientemente que las mitocondrias en cultivos neuronales se fisionan en respuesta al óxido nítrico (NO), siendo esta respuesta previa a la muerte, y acompañándose de daño en la ultraestructura mitocondrial, autofagia, disminución de la producción de ATP y generación de radicales libres (Barsoum et al., 2006). Consecuentemente con esta última idea, Cuervo et al. han sugerido que la autofagia participaría removiendo las mitocondrias dañadas, especialmente en células diferenciadas post-mitóticas como son neuronas, cardiomiocitos y fibras de músculo esquelético (Cuervo et al., 2005).

1.5. Ceramidas y muerte.

La ceramida es un esfingolípido generado casi en todos los procesos de estrés celular y apoptosis, a través de su síntesis *de novo* o por acción de la esfingomielinasa neutra (nSMasa) (Hannun and Luberto, 2000; Bose et al., 1995; Perry, 2000). Este antecedente, junto al conocimiento de que las ceramidas sintéticas de cadena corta detienen el ciclo celular y activan la apoptosis ha llevado a postular que ellas son actores claves en el proceso de muerte celular (van Blitterswijk, 2003). Dado que las ceramidas naturales de cadena larga son insolubles en agua y dificilmente se insertan en la bicapa lipídica desde el exterior, las ceramidas sintéticas de cadena corta, especialmente la N-acetil-esfingosina (C2-ceramida) y N-hexanoil-esfingosina (C6-ceramida) han sido ampliamente utilizadas como herramienta experimental debido a su alta solubilidad en agua y permeabilidad en las membranas celulares (Venkataraman and Futerman, 2000; Kolesnick et al., 2000).

Se ha señalado que los efectos proapoptóticos de la C2-ceramida podrían estar relacionados con su facilidad de difundir al interior de la célula. Así por ejemplo, se ha determinado que la C2-ceramida aplicada exógenamente alcanza el retículo endoplásmico, donde inhibe la vía de síntesis de fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (Bladergroen et al., 1999; Ramos et al., 2000; Ramos et al., 2002). En el caso de FC, esta inhibición ocurre directamente sobre la enzima marcapasos de la vía y obstaculiza severamente el tráfico vesicular (McMaster, 2001), provocando apoptosis en ciertos tipos celulares. Alternativamente, la suplementación de FC rescata a estas células de la apoptosis (Ramos et al., 2000; van der Luit et al., 2002). Otros efectos proapoptóticos de C2-ceramida se han explicado a través de sus acciones sobre la mitocondria, la translocación y activación de la proteína quinasa C ζ (PKC-ζ) (Calcerrada et al., 2002) o en la formación de ceramidas endógenas de cadena larga. Este último proceso puede ocurrir de forma muy rápida (minutos) mediante activación de la nSMasa (Jaffrezou et al., 1998) o en forma lenta (horas) mediante la deacilación/reacilación en el esqueleto de la esfingosina, proceso mediado por una sintasa CoA-dependiente, probablemente localizada en el aparato de Golgi (Ogretmen et al., 2002). Tanto ceramidas de cadena corta o larga inducen la salida del citocromo C desde la mitocondria, sin embargo, las ceramidas de cadena larga no causan la caída del

potencial mitocondrial de membrana (van Blitterswijk, 2003). Finalmente, Siskind y Colombini demostraron que las ceramidas estimulan la formación de un canal que incrementa la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa a distintas proteínas pequeñas, entre las que se incluyen al citocromo C (Siskind and Colombini, 2000).

Las ceramidas también participan en la fisión y fusión de membranas. Las células usarían a SMasas endógenas para alterar la conformación lipídica local y promover la fisión o fusión. Adicionalmente, la producción de ceramidas facilita la formación transitoria y local de estructuras invertidas en membranas que experimentarán procesos dinámicos. En resumen, las ceramidas tienden a autoagregarse y esta formación asimétrica en la membrana podría inducir curvaturas negativas que ayudarían en estos procesos (van Blitterswijk, 2003). Finalmente, existe sólo un trabajo en la literatura que ha estudiado la relación entre apoptosis gatillada por C₂-ceramida y fisión mitocondrial. Szabadkai et al. sobrexpresaron transitoria y establemente células Hela con Drp-1, observando que la fisión mitocondrial inducida por estímulos pro-apoptóticos que involucraban flujos de Ca⁺² intra organelos se veía disminuida (Szabadkai et al., 2004).

Con estos antecedentes y aprovechando la experiencia de nuestro laboratorio en el área de la muerte celular y transducción de señales, se consideró interesante investigar:

- Cuál es la morfología mitocondrial del cardiomiocito en condiciones normales y de estrés.
- La presencia de la maquinaria de la fisión mitocondrial en el cardiomiocito y su modulación por C₂-ceramida.
- La respuesta del sistema de fisión mitocondrial ante eventos que alteren la dinámica mitocondrial.
- La relación de la fisión mitocondrial del cardiomiocito con la muerte celular programada.

2. HIPÓTESIS

Las ceramidas promueven la muerte del cardiomiocito a través de un proceso que involucra fisión mitocondrial.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación la fisión mitocondrial en la muerte del cardiomiocito inducida por ceramidas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de las proteínas que regulan la fisión mitocondrial en el cardiomiocito de rata neonata.
- Caracterizar la morfología mitocondrial normal y la inducida por ceramida en el cardiomiocito.
- Estudiar el efecto de la inhibición de la fusión mitocondrial en la maquinaria de la fisión y morfología mitocondrial del cardiomiocito.
- Relacionar la fisión mitocondrial inducida por ceramidas con alguno de los dos tipos de muerte programada del cardiomiocito.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): N-acetil-D-esfingosina (C2-ceramida, A-7191), dihidroceramida-C2 (DH-C2 C-7980), medio Hank's, medio DME, medio 199, pancreatina, gelatina, triton X-100, 5-bromo-2'-deoxiuridina, yoduro de propidio (PI), carboxi-cianuro-3clorofenilhidrazona (CCCP), anticuerpo anti β-actina (A-5441), anti IgG de conejo conjugado a FITC (F-0382) y anti IgG de ratón conjugado a TRITC (T-5393). En BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, EEUU) se adquirieron los anticuerpos anti Drp-1 (611112) y anti citocromo C (clon 6H2.B4, 556432). El anticuerpo anti Fis-1 (ALX-210-907) se obtuvo de Alexis Biochemicals (San Diego, CA, EEUU) y el anticuerpo anti mtHsp-70 (MA3-028) en ABR-Affinity Bioreagents (Glosen, CO, EEUU). En Gibco BRL (Carlsbad, EEUU) se adquirieron: colagenasa de tipo II, suero fetal bovino (FBS) y suero de ternera (FCS). Hoeschst 33342 (H-1399), mitotracker Green-FM (M75-14) y tetrametilrodamina metil éster perclorato (TMRM, T-668) se compraron a Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU). Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, EEUU) y Pierce (Rockford, EEUU), respectivamente. El reactivo quimioluminiscente para Western Blot ECL se adquirió en Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstaddt, Alemania). El medio de montaje para fluorescencia DAKO se obtuvo de DAKO Corporation (CA, EEUU). Finalmente, el adenovirus AsMfn-2 fue facilitado por el Dr. Antonio Zorzano (Institute of Research in Biomedicine, Barcelona Science Park, Universitat de Barcelona, España).

5.2. Modelo animal

Ratas neonatas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, se utilizaron como modelo de estudio, cumpliendo con todas las normas éticas referidas a la utilización de animales.

5.3. Aislamiento y cultivo primario de cardiomiocitos de rata

Para el aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos, los corazones se removieron, lavaron a 37°C en medio Hank's estéril, desprovistos de sus aurículas y finalmente se homogeneizaron para comenzar con la digestión enzimática, la cual permite obtener las células aisladas. Los ciclos de digestión se realizaron en presencia de colagenasa de tipo II (0,02 gr/100 mL Hank's) y pancreatina (0,06 gr/100 mL Hank's). Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos se aprovechó la adhesión diferencial de los diferentes tipos celulares sobre superficies plásticas. El producto de la digestión se pre-plaqueó en botellas de cultivo de 250 mL durante 2 h en medio DME:M199 (4:1) 10% FBS. Al cabo de ese tiempo, las células se recolectaron, centrifugaron a 1.000 r.p.m durante 5 min y resuspendieron en 21 mL de medio DME:M199 (4:1) 5% FBS y 10% FCS. La concentración celular se determinó mediante microscopía, usando como colorante azul de tripán para visualizar y contar las células vivas y muertas en una cámara de Neubauer.

Conocida su concentración, las células se sembraron en DME:M199 (4:1) 5% FBS y 10% FCS a distintas densidades, según las necesidades experimentales, en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina, sobre placas de cultivo precubiertas con una monocapa de gelatina (2% p/v) y mantenidas a 37° C en una atmósfera húmeda de CO_2 al 5% y 95% de aire.

5.4. Modelo experimental

 C_2 -ceramida se utilizó como estímulo de muerte del cardiomiocito. Los cardiomiocitos se trataron con concentraciones de 20, 30 y 40 μ M de C_2 -ceramida en medio DME:M199 (4:1) suplementado con 10% de SFB, después de 24 h post-lavado. Como controles se utilizaron cardiomiocitos tratados con concentraciones 20, 30 y 40 μ M de DH- C_2 y DMSO en medio equivalente.

5.5. Tratamiento adenoviral

Las células se sembraron a distintas densidades, dependiendo de las necesidades experimentales y luego de 24 h, se transdujeron con el adenovirus AsMfn-2 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1.000 partículas virales por célula o con el adenovirus LC3-GFP (LC3-GFP) a un moi de 300 partículas virales por célula. Las células fueron mantenidas bajo estas condiciones por 24 h, antes de

lavarlas y estimularlas con C_2 -ceramida, DH- C_2 o DMSO. Como control de transducción se utilizó un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección para el caso de AsMfn-2 y AdGFP para el caso de LC3-GFP.

5.6. Preparación de extractos celulares totales

Se prepararon extractos de proteínas totales para:

 Evaluar la presencia de las proteínas involucradas en los procesos de fisión mitocondrial Drp-1 y Fis-1, en cardiomiocitos.

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $2x10^6$ células/placa. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con $80~\mu\text{L}$ de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; tritón X-100 1% v/v; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y Na $_3$ VO $_4$ 1 mM). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 r.p.m durante 10 min a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4x, para ser almacenado, posteriormente a -20°C.

5.7. Preparación de fracciones citosólicas y mitocondriales

Se prepararon fracciones citosólicas y mitocondriales para:

- Estudiar el efecto de C₂-ceramida sobre el nivel de Fis-1 en la fracción mitocondrial
- Estudiar el efecto de C₂-ceramida sobre la translocación de Drp-1 desde la fracción citosólica a la mitocondrial.
- Estudiar el efecto del adenovirus AsMfn-2 sobre el nivel de Mfn-2 en la fracción mitocondrial.

Las células se sembraron en placas de 100 mm a una densidad de $8x10^6$ células/placa. Luego de ser estimuladas, las células se lavaron tres veces con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10,1 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4) frío, posteriormente se les agregó 130 μ L de tampón de homogenización A (Sacarosa 250 mM; Hepes 20 mM; KCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 17 μ g/ml; aprotinina 8 μ g/ml; leupeptina 2 μ g/ml; pH 7.4) y se

rasparon. Los lisados celulares se dejaron reposar 5 min a 4°C y luego se homogenizaron 5 veces en un micro-homogenizador vidrio-vidrio de 0,2 mL (Wheaton). El homogenizado se centrifugó a 750 x g durante 10 min a 4°C. La pella se resuspendió en 260 μ L de Buffer A (suplementado con 1% de Triton X-100), se sonicó por 5 min y se guardó a -20°C (fracción nuclear y mitocondrias pesadas). El sobrenadante se recuperó y se volvió a centrifugar. Tras la segunda centrifugación se recuperó sólo el sobrenadante, el cual se recentrifugó a 10.000 x g por 25 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se guardó a -20°C (fracción citosólica). La pella se resuspendió en 80 μ L de Buffer A y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se eliminó y esta última pella se resuspendió en 20 μ L de Buffer A (suplementado con 1% de Triton X-100), se sonicó por 5 min y se guardó a -20°C (fracción mitocondrial ligera).

5.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos, tanto para la detección de Drp-1, Fis-1 y Mfn-2 en extractos totales, como para su detección en fracciones citosólicas y mitocondriales se cargaron alrededor de 30 µg de extracto proteico. El gel concentrador se preparó al 5% y el separador al 12% para Drp-1 y Fis-1, mientras que para detectar Mfn-2, los geles concentrador y separador fueron al 3 y 10%, respectivamente. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V en tampón de electroforesis.

5.9. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) de $0,45~\mu m$ a 0,45~A durante 60 min para Drp-1 y Fis-1 y, durante 90 min para Mfn-2 en tampón de transferencia.

5.10. Western blot

Una vez transferidas, la membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche sin grasa 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios Drp-1 (dilución 1:750), Fis-1 (dilución 1:1.500) y Mfn-2 (dilución 1:500) en tampón de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1%; leche sin grasa 5% p/v) toda la noche a 4°C con agitación suave.

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1%, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo; anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa para Drp-1 y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa para Fis-1 y Mfn-2, título de 1:5.000 en tampón de bloqueo TBS 1x; Tween-20 al 0,1% para ambos anticuerpos secundarios.

Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot ECL y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes se procesaron con ayuda de los programas computacionales Photoshop 7.0 y USI Scan.

Después de realizar los ensayos de inmunowestern blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 1 h en una solución de rojo Ponceau (rojo ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos. Posteriormente, para corregir las posibles diferencias de cantidades de proteínas cargadas en el gel, se analizaron los niveles de β-actina, en el caso de extractos citosólicos o totales, y de mtHsp-70, en el caso de los extratos mitocondriales, realizándose una reacción de inmunodetección para cada proteína (1° anticuerpo 1:1.000 y 2° anticuerpo anti-ratón 1:5.000 para ambos anticuerpos).

5.11. Inmunofluorescencia indirecta

La técnica de inmunocitoquímica se utilizó para visualizar la distribución subcelular de Drp-1 y Fis-1, así como la del citocromo C y la colocalización de mitocondrias con LC3-GFP, antes y después de la estimulación con C2-ceramida entre 0 y 6 h, además de los controles con DH-C2. Para ello, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 5x10⁵ células/placa, sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos de gelatina (2%). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con parafolmadehído al 4% en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 1 h. Posteriormente, las células se incubaron con Drp-1 (dilución 1:750), Fis-1 (dilución 1:1.000) o citocromo C (1:400) en PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Luego se incubaron por 2 h a temperatura

ambiente y protegidas de la luz con un anticuerpo secundario desarrollado en cabra anti-igG de ratón conjugado a TRITC para Drp-1 y Citocromo C y con un anticuerpo secundario desarrollado en cabra anti-lgG de conejo conjugado a FITC para Fis-1. Los núcleos se tiñeron con Hoeschst 33342 (5 µg/ml) por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se montaron sobre DAKO en portaobjetos, para retardar el decaimiento de la fluorescencia y se observaron mediante microscopía confocal, en un microscopio Carl Zeiss Pascal 5 (Carl Zeiss Microsystems, Alemania). El análisis de las imágenes se realizó en el programa Image J.

5.12. Viabilidad celular mediante citometría de flujo

Los cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $2x10^6$ células/placa. Después de 24 h post-cultivo se sometieron a los distintos tratamientos y se desprendieron de la placa con 500 μ L de tripsina 1x en medio Hank's libre de calcio y magnesio, con el que se incubaron por 3 min, tras lo cual se detuvo la reacción de tripsinización agregando 50 μ L de FBS. Las células se recogieron en tubos Eppendorf y posteriormente se centrifugaron a 1.000 r.p.m. por 5 min y se retiró el sobrenadante. Cada tubo de cardiomiocitos en suspensión se marcó con 10 mL de tampón de tinción que contenía 1 ng/mL de PI en PBS. Las células se evaluaron por citometría de flujo en un citómetro FacSORT Becton Dickinson. Las células se adquirieron y analizaron en el programa WinMDI.

El PI se utilizó para discriminar el proceso necrótico del apoptótico, ya que este compuesto se intercala en el DNA de células que presentan pérdida de integridad de membrana. En cada serie de experimentos se realizaron controles de cardiomiocitos tratados con H₂O₂ 50 mM sin marcar o marcados con PI. De esta manera se estableció la población "cardiomiocitos PI positivos", la cual se uitilizó para las mediciones posteriores.

5.13. Determinación del potencial mitocondrial de membrana

Las imágenes del potencial mitocondrial de membrana se obtuvieron de cardiomiocitos neonatos precargados con TMRM y utilizando un microscopio confocal invertido Carl Zeiss Pascal 5, equipado con una cámara enfriada CCD y un sistema de adquisición de imágenes. Los cardiomiocitos se lavaron tres veces con una solución Krebs (NaCl 145 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 2,6 mM; MgCl₂ 1 mM; Hepes

10 mM; glucosa 5,6 mM; pH 7,4) para remover el suero y luego incubarlas con TMRM (200 nM preparado en Krebs, a partir de una solución stock al 20% en DMSO) por 20 min a 37°C. Posteriormente, los cardiomiocitos se lavaron con solución Krebs y se utilizaron dentro de las siguientes 2 h. Los cubreobjetos conteniendo los cardiomiocitos cargados con TMRM se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500 μL de solución Krebs y colocadas en el microscopio para la determinación de la fluorescencia luego de excitar con un láser a una longitud de onda de 543 nm. Luego, se agregó directamente el estímulo a la solución. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron cada 2 seg para las distintas secuencias temporales. Se utilizó generalmente el lente objetivo de 60x (apertura numérica de 1,2). En la mayoría de las secuencias, las dimensiones de las imágenes fueron de 256 x 256 pixeles. Los niveles del potencial se expresaron como porcentaje de la intensidad de fluorescencia relativa a la fluorescencia basal, un valor estable por al menos 5 min en condiciones de reposo. La disminución en la intensidad de la fluorescencia fue proporcional a la caída del potencial mitocondrial.

5.14. Determinación del volumen mitocondrial

Las imágenes de las mitocondrias se obtuvieron de cardiomiocitos neonatos precargados con Mitotracker Green-FM, utilizando un microscopio confocal invertido Carl Zeiss Pascal 5 equipado con una cámara enfriadda CCD y un sistema de adquisición de imágenes. Los cardiomiocitos pretratados con C2-ceramida, DH-C2 y DMSO por períodos de 0 a 6 h, se lavaron tres veces con una solución Krebs (NaCl 145 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 2,6 mM; MgCl₂ 1 mM; Hepes 10 mM; glucosa 5,6 mM; pH 7,4) para remover el suero y luego incubarlas con Mitotracker Green-FM (400 nM preparado en Krebs, a partir de una solución stock al 20% en DMSO) por 20 min a 37°C. Posteriormente, los cardiomiocitos se lavaron con solución Krebs y se utilizaron dentro de las siguientes 2 h. Los cubreobjetos conteniendo los cardiomiocitos cargados con Mitotacker Green se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500 µL de solución Krebs y colocadas en el microscopio para la determinación de la fluorescencia luego de excitar con un láser de argón a una longitud de onda de 488 nm. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron como secuencias de profundidad en el eje Z cada 0,5 μm, siendo cada secuencia de 10 imágenes. Se utilizó generalmente el lente objetivo de 60X (apertura numérica de 1,2). En la mayoría de las secuencias las dimensiones de las imágenes fueron de 512 x 512 pixeles.

5.15. Análisis digital de las imágenes

Para determinar la fluorescencia de TMRM y su relación con el potencial mitocondrial de membrana, la suma de la intensidad de píxeles se calculó en una sección delimitada por su contorno, prestablecido manualmente (análisis ROI) en zonas que corresponden a mitocondrias periféricas. A fin de aumentar la eficiencia de la manipulación de datos, se generó una secuencia de acciones de forma de obtener valores adimensionales arbitrarios de fluorescencia, los cuales posteriormente se expresaron como porcentaje de fluorescencia relativa.

Para las secuencias obtenidas con Mitotracker Green-FM, la eliminación de la fluorescencia fuera de foco se realizó usando tanto el modelo teórico de algoritmo de deconvolución *no-neighbors*, como el modelo Castleman's PSF (*point spread function*). Una vez que las imágenes se deconvolucionaron, se contó el número de partículas teñidas con Mitotracker Green-FM, así como su volumen, para lo cual se utilizó el programa accesorio 3D Object Counter para Image J.

La cuantificación digital de la colocalización de las imágenes de inmunofluorescencia indirecta se realizó utilizando el programa accesorio Colocalization Finder para Image J.

5.16. Análisis estadístico

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey para determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose como significativo un p<0,05.

6. RESULTADOS

Para responder el primer objetivo planteado en esta memoria, es decir, determinar la presencia de las proteínas que regulan la fisión mitocondrial en el cardiomiocito de rata, se caracterizó la maquinaria de la fisión mitocondrial, la cual se detalla a continuación.

6.1. Expresión de las proteínas de la fisión mitocondrial en cardiomiocitos

La caracterización de la maquinaria de la fisión mitocondrial se inició estudiando la presencia de las proteínas involucradas en este proceso mediante Western blot e inmunofluorescencia indirecta. Las proteínas Drp-1 y Fis-1 se estudiaron en cultivos de cardiomiocitos primarios de rata y células Hela, ya que este último modelo se ha utilizado clásicamente para caracterizar los procesos de fisión mitocondrial (Karbowski and Youle, 2003). La figura 4A muestra la fotografía de un Western blot representativo de cuatro experimentos realizados en forma independiente. Los resultados muestran que tanto en cardiomiocitos como en células Hela se observaron bandas de aproximadamente 79 y 17 kDa, correspondientes a Drp-1 y Fis-1, respectivamente.

La distribución subcelular de ambas proteínas se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta. La figura 4B muestra una fotografía de microscopía confocal representativa en donde se aprecia que la proteína Drp-1 presenta una distribución similar tanto en cardiomiocitos como en células Hela, distinguiéndose en ambos casos una localización citosólica basal, la cual sólo colocaliza parcialmente con mtHsp-70 (marcador mitocondrial). La proteína Fis-1, en cambio, bajo estas mismas condiciones presentó una localización mitocondrial, lo que se demuestra mediante la colocalización con mtHsp-70.

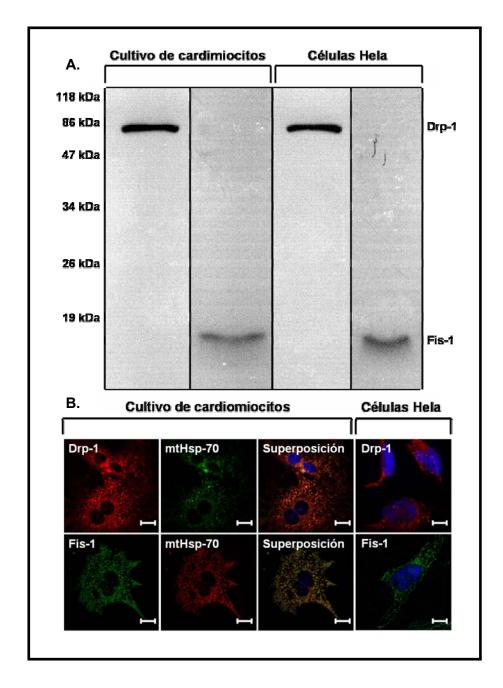


Figura 4. Expresión de Drp-1 y Fis-1 en cardiomiocitos en cultivo y células Hela. (A) Extractos de proteínas totales de ambos tipos celulares se prepararon tal como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12% y Drp-1 y Fis-1 se detectaron por Western blot. La fotografía muestra un gel representativo de cuatro experimentos realizados de forma independiente. (B) Distribuciones subcelulares de Drp-1, Fis-1 y mtHsp-70 en cardiomiocitos en cultivo, determinadas por inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. Escala 10 μm.

Una vez caracterizada la maquinaria de la fisión mitocondrial, como segundo objetivo específico se investigó la morfología mitocondrial normal y los cambios inducidos por C₂-ceramida en el cardiomiocito. Con este fin se realizaron los experimentos detallados a continuación.

6.2. Caracterización de la morfología mitocondrial normal y la que se induce tras el tratamiento con C_2 -ceramida

Szabadkai et al. establecieron una relación entre C2-ceramidas con el proceso de fisión mitocondrial en células Hela que sobrexpresaban Drp-1 (Szabadkai et al., 2004). Sin embargo, este proceso no ha sido investigado en cardiomiocitos de rata y tampoco se ha observado si C2-ceramidas es capaz de desencadenar directamente la fisión mitocondrial. Se sabe que las ceramidas juegan un papel clave en la dinámica de membranas y en diversos procesos biológicos como el tráfico vesicular (van Blitterswijk, 2003). Al mismo tiempo recién se está comenzando a revelar la importancia del proceso de fisión mitocondrial en células post-mitóticas diferenciadas (Cuervo et al., 2005). En la figura 5 se observa la morfología mitocondrial normal y la que se induce después de 6 h de tratamiento con concentraciones crecientes de C2-ceramidas o con 40 μM de DH-C2. En el control y células tratadas con DH-C2 se observan mitocondrias de estructura homogénea y tubular con un volumen aproximado a 1.000 voxels (píxeles al cubo) por partícula, el cual disminuye a medida que aumenta la concentración de C2ceramida. A los 40 µM de C₂-ceramida se observan mitocondrias de morfología heterogénea y esférica, con un volumen que ha disminuido significativamente hasta valores que sólo alcanzan los 300 voxels por partícula mitocondrial. A partir de esta información se determinó que los experimentos siguientes se realizaron con 40 μM de C2-ceramida. En cada una de las imágenes se muestra además el análisis en regiones de interés (ROI) de la zona donde se cuantificó el volumen mitocondrial. Se realizaron 4 experimentos independientes en los cuales se analizaron al menos 5 células.

El curso temporal de este proceso usando una concentración constante de C_2 -ceramida (40 μ M) se muestra en la figura 6. En tres tiempos de tratamiento con C_2 -ceramida 40 μ M se visualizó una disminución del volumen mitocondrial, evento que se relaciona directamente con el proceso de fisión mitocondrial. Estos resultados

colectivamente sugieren que el proceso de fisión mitocondrial inducido con C_2 -ceramida depende de la concentración y tiempo.

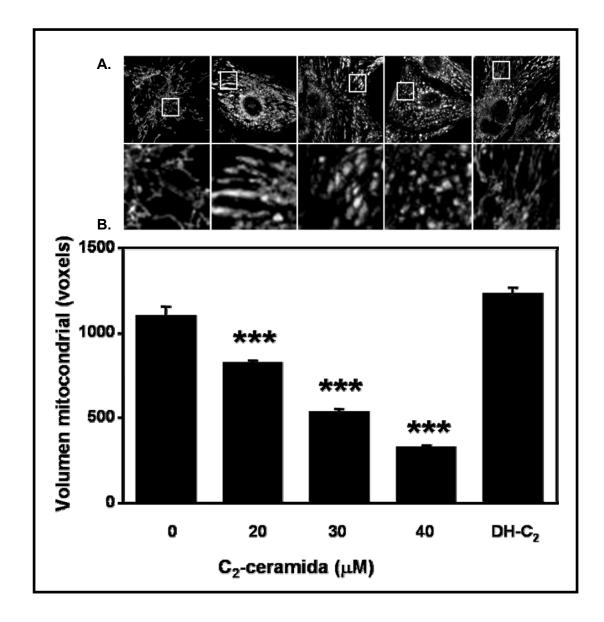


Figura 5. Efecto de la concentración de C₂-ceramida en la morfología mitocondrial del cardiomiocito.

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se trataron con C_2 -ceramida a las concentraciones indicadas o con 40 μM de DH- C_2 durante 6 h. Luego las células se incubaron con la sonda Mitotracker Green-FM por 20 min a 37°C y se visualizaron mediante microscopía confocal. Cada imagen corresponde a la reconstitución en 3D de 10 fotografías tomadas cada 0,5 μm . (B) Cuantificación del volumen mitocondrial. Una vez obtenidas las secuencias de profundidad, las imágenes se deconvolucionaron y analizaron con el programa accesorio 3D Object Counter para Image J. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=4), ***p<0,001 vs 0 μM .

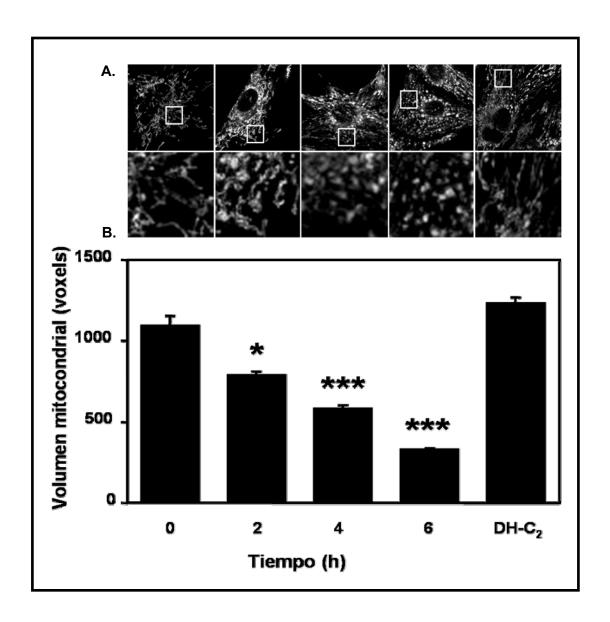


Figura 6. Efecto del tiempo de exposición a C₂-ceramida sobre la morfología mitocondrial de cardiomiocito.

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se trataron con 40 μ M C_2 -ceramida a los tiempos indicados o con 40 μ M de DH- C_2 por 6 h. Luego las células se tiñeron con la sonda Mitotracker Green-FM por 20 min a 37°C y se visualizaron mediante microscopía confocal. Cada imagen corresponde a la reconstitución en 3D de 10 fotografías tomadas cada 0,5 μ m. (B) Cuantificación del volumen mitocondrial. Una vez obtenidas las secuencias de profundidad, las imágenes se deconvolucionaron y posteriormente se analizaron con el programa 3D Object Counter del programa Image J. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=4), *p<0,05, ***p<0,001 vs tiempo 0 h.

La caracterización de la maquinaria de la fisión y posterior estudio de los cambios en la morfología mitocondrial que se inducen tras el tratamiento con C₂-ceramida fueron la base para estudiar los cambios en los niveles relativos de las proteínas de la fisión en cardiomiocitos que se inducen tras este mismo tratamiento. Estos estudios se llevaron a cabo mediante dos estrategias diferentes.

6.3. Efecto de C₂-ceramida en la distribución subcelular de las proteínas de la fisión mitocondrial

En la figura 7A se observa los patrones de distribución de Drp-1 y Fis-1 en condiciones basales y tras la estimulación con C_2 -ceramida. Drp-1 se distribuye basalmente en el citosol y se movilizó hacia la mitocondria post-estímulo con C_2 -ceramida. En cambio Fis-1 se localizó basalmente en la mitocondria, aumentando sus niveles a las 2 h de tratamiento. Estos dos procesos en su conjunto explican que a las 2 h de tratamiento se alcance la mayor y significativa colocalización de ambas proteínas, la cual llega hasta un 20% de los píxeles analizados. Una vez alcanzado este máximo, la colocalización disminuye como se observa en la figura 7B.

Adicionalmente la distribución y niveles de las proteínas de Drp-1 y Fis-1 se analizaron por Western blot en fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial. La figura 8A muestra la estandarización del método de purificación, utilizando β-actina y mtHsp-70 como marcadores de pureza de fracciones citosólicas y mitocondriales, respectivamente. En la figura 8B se representa gráficamente la pureza de ambas fracciones, observándose que ninguna de ellas tuvo una contaminación mayor a las 0,2 veces el control utilizado para cada fracción. Una vez estandarizado el método de purificación, se procedió a la extracción de fracciones desde cardiomiocitos tratados con 40 μM de C₂-ceramida a 2, 4 y 6 h y con DH-C₂ durante 6 h. En la figura 8C se muestra que Drp-1 se translocó hacia la fracción mitocondrial post-tratamiento, fracción en la cual no se encuentra originalmente presente. Adicionalmente en la fracción citosólica Drp-1 incrementó sus niveles considerablemente. El caso de Fis-1, es diferente, ya que sólo es posible observar un efecto claro en la fracción citosólica, donde esta proteína incrementa sus niveles a las 2 h de tratamiento.

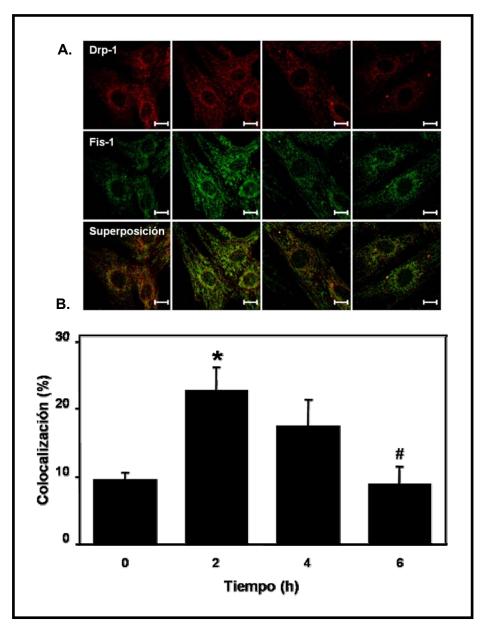


Figura 7. Efecto de C_2 -ceramida sobre la distribución subcelular de Drp-1 y Fis-1 en el cardiomiocito.

(A) Cultivos primarios de cardiomiocito de rata se trataron con C_2 -ceramida 40 μ M por los tiempos indicados. Luego de fijar y permeabilizar las células, Drp-1 y Fis-1 se detectaron por inmunofluorescencia bajo microscopía confocal. Escala 10 μ m. (B) Cuantificación de la colocalización de las imágenes de inmunofluorescencia indirecta utilizando el programa Colocalization Finder para Image J. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=3), *p<0,05 vs 0 h, *p<0,05 vs 2 h.

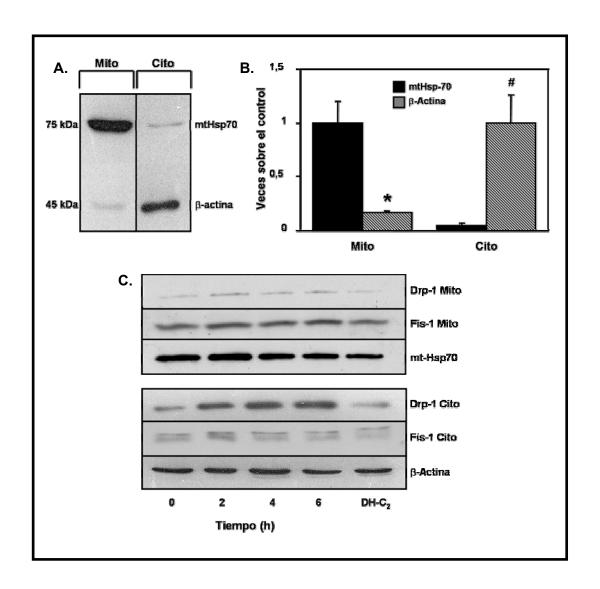


Figura 8. Efecto de C₂-ceramida en los niveles de Drp-1 y Fis-1 en fracciones mitocondriales y citosólicas de cardiomiocitos.

(A) Estandarización del método de preparación de fracciones mitocondriales y citosólicas. Extractos de proteínas de las fracciones mitocondriales (mito) y citosólicas (cito) se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE en geles al 12%. La presencia y niveles de mtHsp-70 y β -actina se determinaron por Western blot, respectivamente. (B) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=4), *p<0,05 vs control fracción mitocondrial, $^{\#}p$ <0,05 vs control fracción citosólica. (C) Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con C_2 —ceramida $40\mu M$ a los tiempos indicados o con 40 μM de DH- C_2 por 6 h. Luego se prepararon extractos de fracciones mitocondriales y citosólicos tal como se indica en Materiales y Métodos. Los niveles de Drp-1 y Fis-1 en estas fracciones se determinaron por Western blot, previa resolución de las mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12%. La figura muestra un experimento representativo de 5 realizados en forma independiente.

El tercer objetivo específico consistió en estudiar el efecto de la disminución de Mfn-2, una proteína de la fusión mitocondrial, en la maquinaria de la fisión y morfología mitocondrial del cardiomicoito.

6.4. Efectos de la disminución de los niveles de Mfn-2 mediante un adenovirus antisentido

Las proteínas Mfn-1 y Mfn-2 son esenciales en el proceso de fusión mitocondrial (Chen et al., 2003; Eura et al., 2003; Ishihara et al., 2003; Cipolat et al., 2004; Chen et al., 2005a), sin embargo, los niveles relativos de expresión de Mfn-1 y 2 varían de acuerdo al tipo celular; Mfn-1 predomina en el cerebro, mientras que Mfn-2 es abundante en corazón y testículo (Eura et al., 2003; Santel et al., 2003). Debido a este último antecedente, se inhibió la maquinaria de fusión mitocondrial mediante un adenovirus antisentido contra Mfn-2 (AsMfn-2) y determinaron sus efectos sobre los niveles de las proteínas de la fisión y morfología mitocondrial basal.

La figura 9A muestra un gel representativo del efecto del AsMfn-2 (MOI = 1.000) sobre los niveles basales de la proteína Mfn-2. Como control de transducción se utilizó el adenovirus vector vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección. La cuantificación de los niveles de Mfn-2 se muestra en la figura 9B, registrándose una significativa disminución de tres veces el control. Esta medición se llevo a cabo en extractos de proteínas mitocondriales y se utilizó como control de carga la proteína mitocondrial mtHsp-70. El resultado obtenido es similar al que ha sido reportado con este mismo adenovirus en otros sistemas experimentales (Soriano et al., 2005).

Una vez que se estableció la multiplicidad de infección de trabajo para el AsMfn, se estudió si esta disminución se acompañaba de cambios en la morfología mitocondrial del cardiomiocito. La figura 10A muestra las fotografías de células controles, tratadas con AdVac o con AsMfn-2. En esta última condición se apreció que las mitocondrias adoptaban una morfología heterogénea, pero sin alcanzar el típico patrón cilíndrico presente en la fisión mitocondrial. Sin embargo, el volumen de las partículas mitocondriales disminuyó significativamente, alcanzando sólo 700 vóxels (figura 10B). Cabe destacar que el control de transducción con AdVac también mostró una alteración de los valores basles del volumen de las partículas mitocondriales, ya que el control sin tratamiento alcanzó un volumen del orden de

1000 vóxels, mientras que éste alcanza valores que bordean los 1200 vóxels por partícula mitocondrial.

Finalmente, se procedió a estudiar si la transducción de las células alteraba de alguna forma la distribución normal de las proteínas de la fisión mitocondrial Drp-1 y Fis-1. En la figura 11A, podemos observar un claro cambio en el patrón de distribución de Drp-1, la cual tras la infección aumenta su presencia a nivel de las mitocondrias, mientras que Fis-1 aumenta sus niveles celulares aparentes. Al realizar la cuantificación de las imágenes de inmunofluorescencia indirecta (figura 11B) podemos observar que la colocalización basal aumenta tras el tratamiento de las células con AsMfn-2 alcanzando valores de aproximadamente un 20 % de los píxeles analizados. Cabe destacar nuevamente, que el control de transducción también se ve afectado con el tratamiento adenoviral ya que ambas proteínas de la fisión mitocondrial poseen sus niveles celulares aparentes disminuidos y una colocalización basal menor a la de las células control.

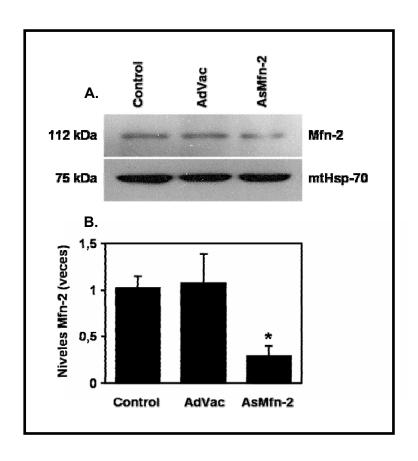


Figura 9. Disminución de los niveles de Mfn-2 mediante un adenovirus antisentido. (A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron con un adenovirus AsMfn-2 (MOI = 1.000) o con un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección por 24 h. Luego las células se lisaron y se prepararon fracciones mitocondriales en la forma indicada en Materiales y Métodos. Los niveles de Mfn-2 y mtHsp-70 se determinaron por Western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 10%. La fotografía mostrada es representativa de 4 experimentos independientes. (B) Cuantificación densitométrica utilizando el programa USI Scan. Los resultados corresponden al promedio ± SEM (n=4), *p<0,05 vs control de transducción con AdVac.

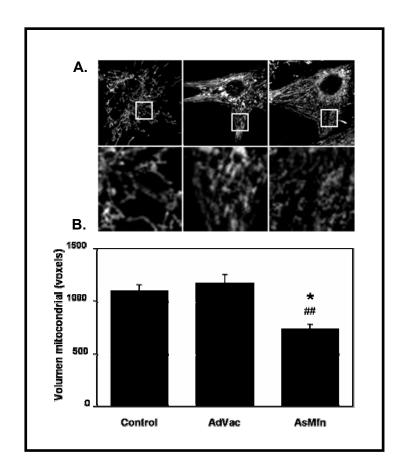


Figura 10. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre la morfología mitocondrial del cardiomiocito en cultivo.

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron con un adenovirus AsMfn-2 (MOI = 1.000) o con un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección por 24 h. Luego las células se incubaron con la sonda Mitotracker Green-FM por 20 min a 37°C y se visualizaron por microscopía confocal. Cada imagen corresponde a la reconstitución en 3D de 10 fotografías tomadas cada 0,5 μ m. (B) Cuantificación del volumen mitocondrial. Una vez obtenidas las secuencias de profundidad, las imágenes se deconvolucionaron y se analizaron con el programa accesorio 3D Object Counter del programa Image J. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=3), *p<0,05 vs control, *#p<0,01 vs control de transducción con AdVac.

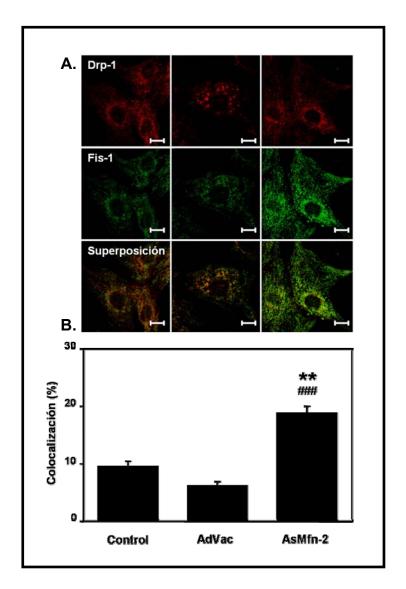


Figura 11. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre la distribución subcelular de Drp-1 y Fis-1 en el cardiomiocito en cultivo.

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron con un adenovirus AsMfn-2 (MOI = 1.000) o con un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección por 24 h. Luego Drp-1 y Fis-1 se inmunodetectaron por microscopía confocal. Escala 10 $\mu m.$ (B) Cuantificación de la colocalización de las imágenes de inmunofluorescencia indirecta utilizando el programa Colocalization Finder para Image J. Los resultados corresponden al promedio± SEM (n=3), **p<0,05 vs control, *##p<0,01 vs control de transducción con AdVac.

Una vez que se analizó el efecto de AsMfn-2 sobre la morfología basal de las mitocondrias en cultivo y sobre la distribución de Drp-1 y Fis-1, se procedió a estudiar si esta misma condición también era capaz de alterar los efectos que ya se habían observado al tratar las células con C₂-ceramida. Con este fin se utilizaron dos estrategias experimentales diferentes, las cuales se describen a continuación.

6.5. Efectos de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre los cambios en la morfología y maquinaría mitocondrial inducidos por C_2 -ceramida en el cardiomiocito

La disminución de los niveles de Mfn-2 fue capaz de alterar la morfología mitocondrial basal sin llegar al patrón circular característico de la fisión, sin embargo, al combinar la infección adenoviral y el tratamiento con C2-ceramida a tiempos crecientes, se observa claramente que el proceso de fisión descrito sólo para el tratamiento con C2-ceramida se incrementa significativamente al inhibir la fusión mitocondrial. En la figura 12A podemos observar fotografías en las que se observa la morfología característica de la fisión mitocondrial en las células tratadas con AsMfn-2 y con C₂-ceramida 40 μM a las 6 h de tratamiento. En este punto, las células presentan una morfología característicamente esférica y al cuantificar el volumen de las partículas mitocondriales (figura 12B) presentan la máxima significancia. Adicionalmente, este fenómeno también presenta un comportamiento concentración dependiente, similar al observado sin el tratamiento de las células con AsMfn-2, sin embargo, los valores que se obtienen al cuantificar el volumen mitocondrial nos indican que el proceso de fisión es mayor y se ha incrementado. Ejemplo de esto último, es que al tratar las células con 40 μM de C₂-ceramida a las 6 h con el AdVac la células alcanzan valores de aproximadamente 400 voxels por mitocondria, mientras que el tratamiento con AsMfn-2 disminuye estos valores a la mitad. Esta tendencia se cumple para todos los tiempos es que las células fueron tratadas.

Finalmente, también se analizaron los efectos del AsMfn-2 sobre la distribución de Drp-1 y Fis-1 inducida por C₂-ceramida. La figura 13 muestra un resultado similar al obtenido en el experimento anterior, es decir la tendencia observada con C₂-ceramida se mantiene, pero su efecto se acentúa en células transducidas con AsMfn-2. Al cuantificar la colocalización alcanzada entre las dos proteínas de la fisión mitocondrial, su máximo efecto se alcanzó a las 2 h de tratamiento. Sin embargo, el porcentaje de píxeles colocalizados fue mayor, alcanzando hasta un 30 %, mientras que la colocalización máxima con el AdVac sólo fue la mitad de este valor.

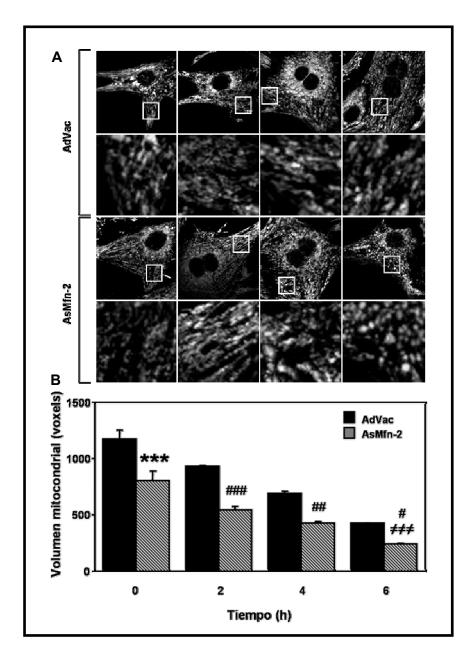
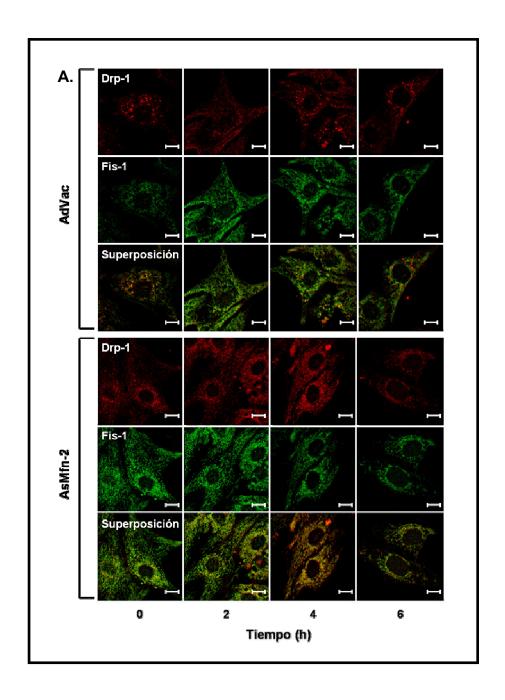


Figura 12. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre la morfología mitocondrial inducida por C₂-ceramida en el cardiomiocito.

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron con un adenovirus AsMfn-2 (MOI = 1.000) o con un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección por 24 h. Luego las células se trataron con 40 μM de C_2 -ceramida a los tiempos indicados o 40 μM de DH- C_2 por 6 h. Posteriormente las células se incubaron con la sonda Mitotracker Green-FM por 20 min a 37°C y se visualizaron por microscopía confocal. Cada imagen mostrada corresponde a la reconstitución en 3D de 10 fotografías tomadas cada 0,5 μm . (B) Cuantificación del volumen mitocondrial. Una vez obtenidas las secuencias de profundidad, las imágenes se deconvolucionaron y se analizaron con el programa accesorio 3D Object Counter para Image J. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=3), ***p<0,05 vs AdVac 0 h, *p<0,05, ***p<0,01, ***p<0,001 vs controles a cada uno de los respectivos tiempos con AdVac, ***p<0,001 vs control AsMfn-2 0 h.



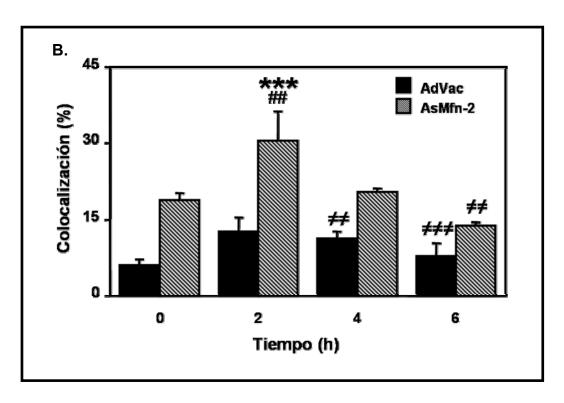


Figura 13. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre los cambios en la distribución subcelular de Drp-1 y Fis-1 inducida por C_2 -ceramida en el cardiomiocito. (A) Cultivos primarios de cardiomiocitos se transdujeron con un adenovirus AsMfn-2 (MOI= 1.000) o con un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección por 24 h. Luego las células se expusieron a C_2 -ceramida 40 μ M a los tiempos indicados, inmunodetectándose Drp-1 y Fis-1 por microscopía confocal. Escala 10 μ m. (B) Cuantificación de la colocalización de las imágenes de inmunofluorescencia indirecta utilizando el programa Colocalization Finder del programa Image J. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=3), ****p<0,001 vs control transducción con AdVac 0 h, ***p<0,01 vs control transducción con AdVac 2 h, ***p<0,001 vs adenovirus AsMfn-2 2 h.

El cuarto objetivo específico de esta memoria fue relacionar la fisión mitocondrial inducida por ceramidas con alguno de los dos tipos de muerte programada del cardiomiocito. Por este motivo se estudió la relación de C₂-ceramida con apoptosis y autofagía.

6.6. C₂-ceramidas y apoptosis.

Distintos estudios han demostrado que la morfología mitocondrial cambia durante la apoptosis dando como resultado mitocondrias pequeñas, esféricas y más numerosas (Mancini et al., 1997; Desagher and Martinou, 2000; Frank et al., 2001; Pinton et al., 2001; Jagasia et al., 2005). Dado que en el presente trabajo observamos inducción del proceso de fisión mitocondrial por C2-ceramida y que se conoce que este esfingolípido gatilla la apoptosis de diversos tipos celulares (van Blitterswijk, 2003), se estudiaron dos eventos tempranos de este proceso de muerte celular, como son el cambio en el potencial mitocondrial y la salida del citocromo c al citosol. La figura 14 muestra los registros en los cambios de la fluorescencia de TMRM, los que equivalen a los cambios en los niveles del potencial mitocondrial de membrana mitocondrial inducidos por C_2 -ceramida (40 μ M). En condiciones basales de reposo, el 76% de las células (19 de 25 células, de 5 cultivos independientes) respondieron con una señal que comenzó aproximadamente a los 70 seg post-tratamiento con C2-ceramida y que llegó a una disminución del 100% de la fluorescencia. El efecto de C₂-ceramida sobre cardiomiocitos mantenidos en medio de reposo se muestra en la figura 14A, donde se observa una serie de imágenes adquiridas a los tiempos indicados. Los cambios en la fluorescencia relativa se muestran en la figura 14B. Como se esperaba, el vehículo DMSO, así como el control con DH-C2 no tuvieron efectos sobre los niveles del potencial mitocondrial (figura 14C). Todos los análisis se llevaron a cabo mediante análisis ROI (región de interés) en zonas de mitocondrias periféricas.

Como segunda aproximación experimental se determinó la salida del citocromo C desde la mitocondria hacia el citosol mediante inmunofluorescencia indirecta. Las imágenes que dan cuenta de este proceso se observan en la figura 15A, donde el citocromo C y la proteína mitocondrial mtHsp-70 se observan en colores rojo y verde, respectivamente. La pérdida de la colocalización de ambas proteínas da cuenta de la salida de la primera hacia el citosol. Esto último se cuantificó en la

figura 15B, alcanzándose una máxima pérdida de colocalización a las 6 h del tratamiento. Al mismo tiempo se cuantificaron los cambios en la fluorescencia relativa asociada a la proteína citocromo C (figura 15C), observándose que la tendencia descrita en el gráfico de la colocalizacón se mantiene. Un aumento en la fluorescencia de la proteína se observó a las 2 h, seguida de una disminución significativa a las 6 h. Este aumento puede relacionarse con un incremento en los niveles aparentes de la proteína y la disminución de la fluorescencia con una dilución a nivel del citosol de la misma.

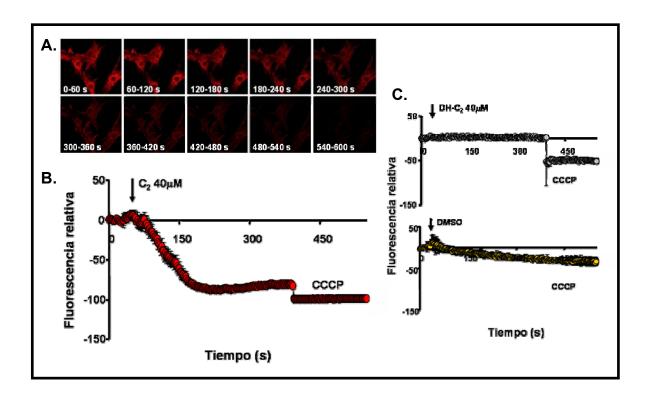


Figura 14. Efecto de C₂-ceramida sobre el potencial de membrana mitocondrial en el cardiomiocito.

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas se preincubaron con la sonda TMRM por 20 min a 37°C y luego se estimularon con C_2 -ceramida 40 μ M durante 600 seg. Las células se visualizaron y fotografiaron mediante microscopía confocal, obteniéndose registros de los cambios en la fluorescencia relativa inducidos por 40 μ M de C_2 -ceramida (B), 40 μ M de DH- C_2 y DMSO (C). Al final de la cinética temporal se muestra el efecto de CCCP, desacoplador mitocondrial. Cada registro es representativo de, al menos, 5 experimentos independientes.

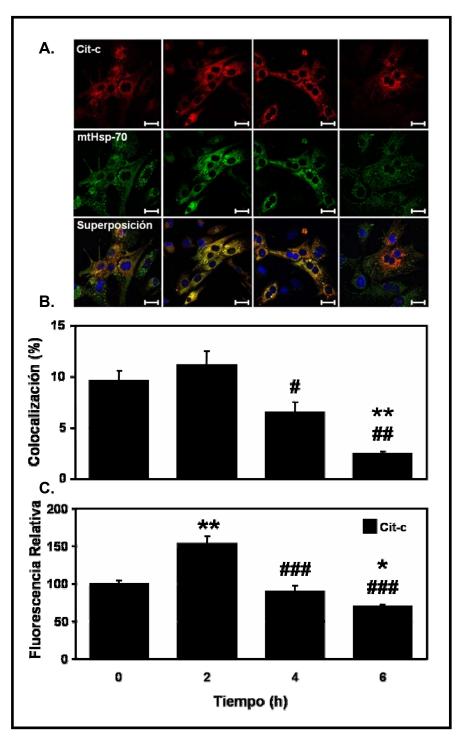


Figura 15. Efecto de C₂-ceramida sobre la salida del citocromo C desde la mitocondria del cardiomiocito.

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se trataron con 40 μM de C_2 -ceramida por los tiempos indicados. Luego de fijar y permeabilizar las células, el citocromo C (cit-c) y mtHsp-70 se detectaron por inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal. Escala 20 μm . (B) Cuantificación de la colocalización de las imágenes de inmunofluorescencia indirecta utilizando el programa Colocalization Finder del Image J. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=3), **p<0,05 vs 0 h, *p<0,05 y **p<0,01 vs 2 h. (C) Cuantificación de la inmunofluorescencia indirecta asociada a cit-c. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=3), *p<0,05 y **p<0,01 vs 0 h, *##p<0,001 vs 2 h.

6.7. C₂-ceramidas y autofagia.

La autofagia en una célula normal es un mecanismo eficiente para la degradación de estructuras biológicas dañadas, tal es el caso de las mitocondrias. Dado que también la fisión mitocondrial previene la acumulación de mitocondrias gigantes y que ellas se recambian por autofagia (Cuervo et al., 2005), se estudió si existe una relación entre estos dos eventos. Para ello se utilzó un marcador de autofagia universalmente aceptado como es la proteína LC3-GFP, la cual es capaz de acumularse en vacuolas autofágicas (Kabeya et al., 2000).

En células transducidas con el adenovirus LC3-GFP (MOI=300) o con un adenovirus control (GFP, a la misma multiplicidad de infección) se determinó la localización de mtHsp-70 por inmunofluorescencia indirecta. En la figura 16 se muestran células transducidas y además marcadas con el anticuerpo anti mtHsp-70, donde no se observa en ninguna de las condiciones experimentales colocalización de la proteína mitocondrial mtHsp-70 con la proteína LC3-GFP. En todos los casos analizados, la proteína LC3-GFP presentó un patrón difuso y una expresión homogénea en el citosol. Debido a este resultado no se continuó estudiando la relación del proceso de fisión mitocondrial inducido por C2-ceramida con la autofagia.

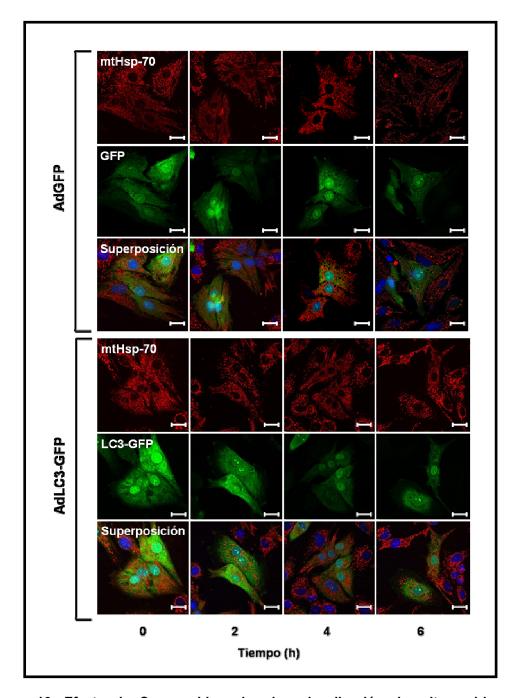


Figura 16. Efecto de C_2 -ceramida sobre la colocalización de mitocondrias con vacuolas autofágicas.

Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata se transdujeron con el adenovirus LC3-GFP (MOI = 300) o con un adenovirus GFP (control) a la misma multiplicidad de infección por 24 h. Luego las células se trataron con 40 μ M C₂-ceramida a los tiempos indicados. Posteriormente se detectó la fluorescencia verde de la proteína GFP o la fluorescencia roja del mtHSP-70 por microscopía confocal. Escala 20 μ m.

6.8. C₂-ceramidas y viabilidad celular

Dado que se encontró una relación entre C_2 -ceramida y dos eventos tempranos de la apoptosis, se estudió si este estímulo, bajo estas condiciones experimentales, afectaba la sobrevida del cardiomiocito. Para esto se determinó la viabilidad por exclusión de yoduro de propidio y citometría de flujo. Las células se trataron con 20, 30 y 40 μ M de C_2 -ceramida por 6 h. Los resultados mostraron una disminución de la viabilidad dependiente de la concentración, siendo significativa con 30 y 40 μ M de C_2 -ceramida (figura 17). Los histogramas obtenidos por citometría de flujo se muestran en la figura 17A, observándose un aumento de la permeabilidad al yoduro de propidio. En las células controles se detectaron tres poblaciones. La primera de la izquierda correspondió a las células viables, la cuales disminuyeron a medida que aumentó la concentración de C_2 -ceramida. La figura 17B muestra la cuantificación de éstos datos, siendo notable que 40 μ M de C_2 -ceramida disminuyó significativamente la viabilidad hasta valores cercanos al 65% de la población, es decir causando una muerte de alrededor de un 35% de la población.

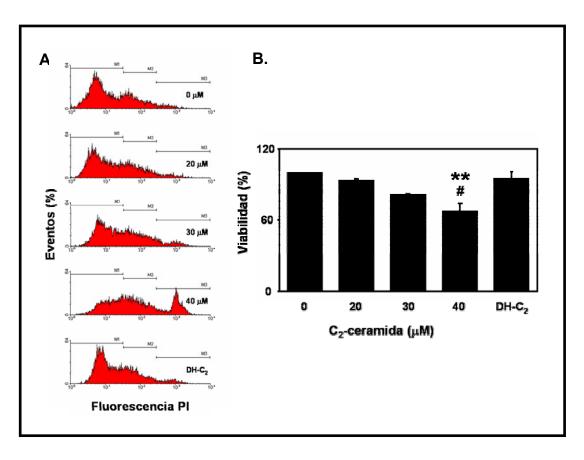


Figura 17. Efecto de C₂-ceramida en la viabilidad del cardiomiocito.

(A) Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata se expusieron a C_2 -ceramida a las concentraciones indicadas o 40 μ M de DH- C_2 por 6 h. Luego las células se tripsinizaron y se incubaron con yoduro de propidio (PI) y se cuantificaron las viabilidades por exclusión de este colorante y citometría de flujo. Los datos se adquirieron y analizaron en el programa WinMDI, obteniéndose histogramas como los mostrados. (B) Cuantificación de la viabilidad celular. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=3), **p<0,01 vs control (0 μ M), *#p<0,05 vs DH- C_2 40 μ M.

6.9. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 en los eventos apotóticos tempranos inducidos por C₂-ceramida en el cardiomiocito

Se sabe que la inducción de la fusión mitocondrial por sobrexpresión de Mfn-1 o Mfn-2 inhibe el proceso apoptótico (Sugioka et al., 2004) así como que la disminución de los niveles de OPA-1, también resultan en fisión mitocondrial, liberación espontánea del citocromo C y apoptosis (Olichon et al., 2003). Anteriormente se mostró que C₂-ceramida disminuía la viabilidad celular previa caída del potencial de membrana mitocondrial y salida del citocoromo C desde la mitocondria al citosol. Todos estos antecedentes nos motivaron a investigar si la disminución de los niveles de Mfn-2, mediante el adenovirus antisentido, era capaz de alterar estos dos eventos apotóticos tal como había ocurrido con la morfología mitocondrial y la distribución de las proteínas de la fisión.

Para estudiar el efecto de C₂-ceramida sobre células tratadas con AsMf-2, todos los experimentos se compararon con células tratadas con AdVac que respondieron positivamente al estímulo. En la figura 18 se muestran los registros de los cambios en la fluorescencia de TMRM inducidos por C₂-ceramida 40 μM en las células transducidas. En 5 de 5 experimentos se observó una respuesta más rápida, la cual alcanzó un mínimo de fluorescencia en forma casi instantánea a la adición del estímulo. Este efecto se muestra en la figura 18A, en la que presenta una serie de imágenes adquiridas a los tiempos indicados. Los cambios en la fluorescencia relativa se muestran en la figura 18B. Todos los análisis se llevaron a cabo mediante análisis ROI (región de interés) en zonas de mitocondrias periféricas.

Como segunda aproximación se determinó la salida del citocromo C desde la mitocondria hacia el citosol. En la figura 19A se muestran las imágenes que dan cuenta de la localización del citocromo C (color rojo) y cuantificación de los cambios en la fluorescencia relativa asociada a esta proteína. La figura 19B muestra que la tendencia vista en las células sin transducir se mantiene. Sin embargo, en este caso, C2-ceramida aumentó significativamente la fluorescencia asociada al citocromo C a las 2 h, la que no alcanza a disminuir a las 6 h como lo hacía anteriormente. Es probable que la disminución de los niveles de Mfn-2 altere la salida del citocromo C desde la mitocondria al citosol, modificando de alguna medida la dinámica de las membranas mitocondriales.

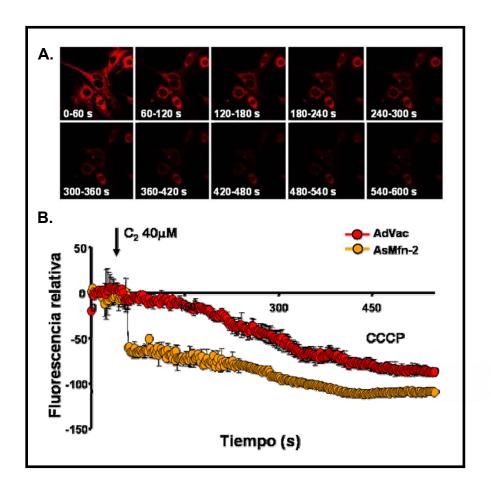


Figura 18. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 en la disipación del potencial de membrana mitocondrial estimulado por C_2 -ceramida en el cardiomiocito. (A) Las células se transdujeron con el adenovirus AsMfn-2 (MOI = 1.000) o con un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección por 24 h. Luego las células se incubaron con la sonda TMRM por 20 min a 37°C y se visualizaron por microscopía confocal. La serie de imágenes muestra cardiomiocitos estimulados con C_2 -ceramida 40 μ M. (B) Los cambios en la fluorescencia relativa inducidos por C_2 -ceramida en células transducidas con loas adenovirus AsMfn-2 o AdVac. Al final de la cinética se observa el efecto de CCCP, un desacoplador mitocondrial. El registro mostrado es representativo de un experimento de al menos 5, realizados en forma independiente.

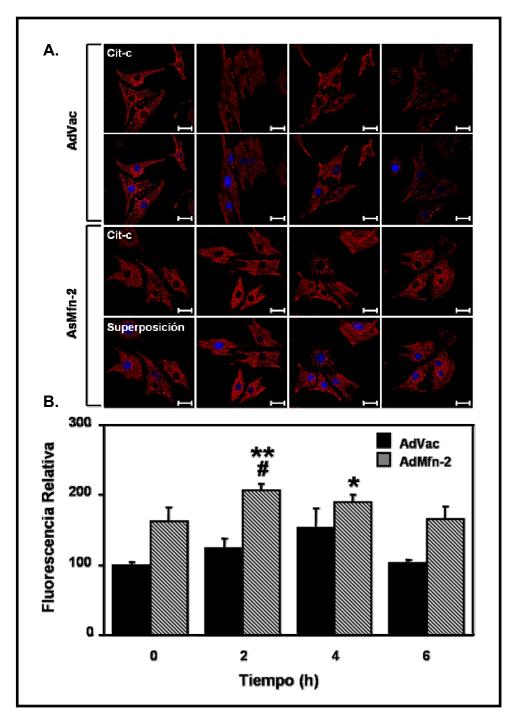


Figura 19. Efecto de la disminución de los niveles de Mfn-2 en la salida del citocromo C estimulada por C₂-ceramida desde la mitocondria del cardiomiocito.

Las células se transdujeron con el adenovirus AsMfn-2 (MOI = 1.000) o con un vector adenoviral vacío (AdVac) a la misma multiplicidad de infección (control) por 24 h y se trataron con C_2 -ceramida 40 μ M a los tiempos indicados. Luego de fijar y permeabilizar las células, el citocromo C (Cit-c) se detectó por inmunofluorescencia indirecta y posteriormente se visualizació por microscopía confocal. Escala 20 μ m. (B) Cuantificación de la inmunofluorescencia indirecta asociada a Cit-c. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=3), *p<0,05 y **p<0,01 vs control transducción con AdVac 0 h, *p<0,05 vs control transducción con AdVac 2 h.

7. DISCUSIÓN

Las mitocondrias juegan un papel esencial en la mantención de la homeostasis de las células eucariontes, proveyendo de abundante energía generada a través de la fosforilación oxidativa. Además, son el compartimiento en donde tienen lugar numerosas reacciones esenciales en el metabolismo y juegan un papel clave en la muerte y envejecimiento celular (Shcheffler, 2001). En el corazón, este rol energético cobra mayor relevancia dada la dependencia energética de ATP que tiene este órgano para mantener su actividad contráctil sistólica y diastólica. La hipótesis de que ciertas patologías cardíacas podrían estar ligadas a la incapacidad del corazón para alcanzar requerimientos energéticos mínimos tiene cierta lógica (Ingwall and Weiss, 2004), posicionando a la mitocondria como un organelo subcelular clave en su funcionamiento. El corazón está formado por varios tipos celulares, siendo los fibroblastos y cardiomiocitos los más importantes. Estas últimas células, terminalmente diferenciadas, cesan de proliferar poco después del nacimiento y son las unidades contráctiles funcionales del corazón. Esta restricción evolutiva del cardiomiocito para proliferar, hace a este órgano muy vulnerable a diferentes situaciones de estrés y a cualquier estímulo que remodele sus organelos (Chien et al., 1991).

7.1. La maquinaria de la fisión mitocondrial en el cardiomiocito

Hasta la fecha no hay publicaciones que describan la presencia y distribución de las proteínas de la maquinaria de fisión mitocondrial en el cardiomiocito. Sólo dos trabajos han relacionado la dinámica mitocondrial del cardiomiocito senescente con la acumulación de mitocondrias defectuosas y de gran tamaño, eventos que además se han asociado a la pérdida de funcionalidad mitocondrial y aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Terman et al., 2003; Terman et al., 2004). Recientemente, Barsoum et al. describieron procesos de fisión mitocondrial en cultivos neuronales expuestos a oxido nítrico (NO), siendo esta respuesta previa a la muerte y acompañada de daño en la ultraestructura mitocondrial, autofagia, disminución de la producción de ATP y generación de ROS (Barsoum et al., 2006). Estos estudios son las únicas referencias en dónde se describen procesos de fisión mitocondrial en cultivos primarios celulares normales. Cabe destacar que al

mayoría de nuestro actual conocimiento acerca de la fisión/fusión mitocondrial derivada de estudios en levaduras y/o líneas tumorales o transformadas, donde la dinámica de estos eventos no es fisiológica (Parone and Martinou, 2006).

En el presente trabajo se investigó por primera vez la presencia de la maquinaria de la fisión mitocondrial en el cardiomiocito y si es regulada por ceramidas. Nuestros resultados mostraron que tanto las proteínas Drp-1 como Fis-1 están presentes en el cardiomiocito, siendo sus distribuciones subcelulares similares al de las células tumorales Hela, modelo muy utilizado en al investigación de estos procesos (Figura 4A y B).

7.2. Ceramidas y fisión mitocondrial

Las ceramidas son esfingolípidos que se generan y funcionan como segundos mensajeros en respuesta a estrés y estímulos de muerte mediante dos mecanismos, la síntesis de novo o a través de la acción hidrolítica de las esfingomielinasas ácida o neutra. Las ceramidas de cadena corta y larga detienen el ciclo celular y gatillan muerte por apoptosis y/o necrosis, procesos que dependen de cada tipo celular en particular (Van Blitterswijk et al., 2003). Las ceramidas endoógenas generadas pueden alterar directamente la homeostasis de diferentes organelos subcelulares, entre ellos las mitocondrias. Se ha mostrado que C2-ceramida, un esfingolipido de cadena corta y permeable, inhibe el complejo respiratorio III, alterando el potencial de membrana mitocondrial y promoviendo la salida del citocromo C (Van Blitterswijk et al., 2003; Siskind et al., 2006).

En cardiomiocitos, las ceramidas median la muerte inducida por isquemia-reperfusión o TNFα (Krown et al., 1996; Bielawska et al., 1997), induciendo activación de las vías extrínseca e intrínseca (Wang et al., 2000). En células Hela, C₂-ceramida estimula la fragmentación de la red mitocondrial y la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico (Pinton et al., 2001). En células que sobrexpresan Drp-1, este evento se atenúa, indicando que la integridad de la red mitocondrial se requiere para la ejecución de la apoptosis dependiente de ceramidas (Szabadkai et al., 2004). Nuestros resultados muestran, por primera vez, que C₂-ceramida estimula la fragmentación de la red mitocondrial bajo condiciones de integridad de este organelo, siendo este proceso dependiente tanto del tiempo

como de la concentración de C_2 -ceramida (Figuras 5A-B y 6A-B). Coincidentemente, esta fragmentación se acompañó de cambios en los niveles y patrón de distribución de las proteínas Drp-1 y Fis-1 (Figuras 7A-B y 8A-C). Drp-1 aumentó su translocación desde el citosol a la mitocondria, mientras que Fis-1, una proteína mitocondrial, aumentó sus niveles relativos, siendo la fragmentación de la red más evidente con 40 μ M de C_2 -ceramida por 6 h. Adicionalmente, nuestros resultados indican que la redistribución de la maquinaria mitocondrial es previa al proceso de fragmentación de la red formada por este organelo.

7.3. Efectos de la disminución de los niveles de Mfn-2 sobre la fisión mitocondrial

La proteína de Drosophila melanogaster Fzo fue el primer protagonista identificado involucrado en la fusión mitocondrial (Hales and Fuller, 1997). Las mitofusinas 1 y 2 son los dos homólogos de Fzo en mamíferos (Santel and Fuller, 2001), siendo ambas proteínas necesarias en este proceso. De esta forma, la sobrexpresión de Mfn-1 en células carentes de Mfn-2 sólo rescata parcialmente la morfología mitocondrial y viceversa (Chen et al., 2003). Durante la fusión mitocondrial se requiere la interacción de mitofusinas presentes en mitocondrias adyacentes, formando complejos homo y heterotípicos (Chen et al., 2003; Koshiba et al., 2004). En una primera etapa hay un acercamiento entre mitocondrias mediado por distintas mitofusinas localizadas en mitocondrias opuestas, formando un complejo dimérico antiparalelo dependiente de interacciones hidrofóbicas (Koshiba et al., 2004). El segundo paso produce una distorsión, posiblemente mediada por la hidrólisis de GTP, para generar la fusión de las membranas externas de las mitocondrias. En nuestro modelo se investigaron los eventos que se desencadenan en la morfología mitocondrial normal y en la distribución de las proteínas de la fisión mitocondrial, al disminuir los niveles de la proteína Mfn-2 mediante una estrategia adenoviral antisentido contra su mRNA (AsMfn-2). En una primera instancia se observó que los niveles de la proteína Mfn-2 disminuyeron hasta llegar a un 40% de la cantidad inicial (Figura 9A-B) y que esta reducción se acompañó de fragmentación de la red mitocondrial, efecto que se explica por la ruptura del equilibrio en la dinámica mitocondrial, sostenida por eventos opuestos y paralelos de fusión y fisión (Figura 10A-B) (Westerman, 2002). En nuestro caso hubo una redistribución inmediata de Drp-1 y un aumento en los niveles de Fis-1

(Figura 11A-B). Actualmente, no existen antecedentes que expliquen porqué aumentaron los niveles de Fis-1, dado que se desconoce totalmente cómo se regula esta proteína. Sin embargo, tomografías de microscopía electrónica de mitocondrias han revelado que durante el proceso de fisión, se produce disrupción de las crestas mitocondriales, resultando en su apertura y expansión del espacio intermembrana. Este fenómeno se ha comenzado a utilizar para explicar la existencia de diferentes pooles de proteínas pro-apoptóticas como el citocromo c y su rápida liberación desde la mitocondria (Scorrano et al., 2002; Akao et al., 2003; Kim et al., 2004, Parone and Martinou, 2006) y también pude ser utilizado para dar cuenta del rápido aumento de Fis-1 como el registrado en nuestro modelo. En concordancia con estos últimos hallazgos, también se observó que los cambios inducidos por C₂-ceramida en la morfología y distribución proteica se incrementaron al disminuir previamente los niveles de Mfn-2 en nuestras células (Figuras 12A-B y 13A-B), indicando que al inhibir la fusión se desplaza el equilibrio morfológico mitocondrial e incrementan los procesos relacionados con la fisión de la red mitocondrial.

Adicionalmente en la literatura, también se ha documentado que Mfn-2 tendría un papel en el metabolismo mitocondrial. Skulachev y col. fueron pioneros al proponer un papel de la red mitocondrial en el metabolismo celular (Amchenkova et al., 1988). En dichos estudios, Skulachev y col. demostraron que las mitocondrias están interconectadas, formando una unidad eléctrica que comparte un mismo potencial de membrana. Estas observaciones junto a evidencias que las redes mitocondriales más extensas se encuentran en células con elevado gasto energético, como son células musculares y cardíacas, llevaron a estos investigadores a proponer la teoría de los cables transmisores de energía (Skulachev, 2001), en la que se postula que una red mitocondrial extensa es eficiente en condiciones en que la disponibilidad de oxígeno en la región central de la célula es limitante para mantener la actividad de la cadena respiratoria. En estas condiciones, el funcionamiento mitocondrial podría ser de tal manera que las mitocondrias localizadas cerca de la membrana citoplasmática consumiesen el oxígeno aportado por los capilares y el gradiente de protones generado por la cadena respiratoria se transmitiría a las mitocondrias perinucleares vecinas, donde tendría lugar la síntesis del ATP. Existen diversas evidencias del papel de las mitofusinas en el mantenimiento del metabolismo mitocondrial, especialmente Mfn2. La función de la actividad respiratoria de células deficientes en Mfn-1 o Mfn-2 está altamente comprometida como se demostró con la sonda fluorescente sensible al potencial mitocondrial, MitoTrackerRed, así células deficientes en Mfn-1 o Mfn-2 no exhiben fluorescencia asociada a este fenómeno (Chen et al., 2003). Nuestros resultados mostraron que la exposición de los cardiomiocitos a C2-ceramida gatilló una caída en el potencial de membrana mitocondrial, medido con la sonda TMRM, y que a diferencia del trabajo de Chen, la disminución de los niveles de Mfn-2 se asoció a una reducción más rápida y aguda de la fluorescencia de cardiomiocitos expuestos a C2-ceramida, pero no a una ausencia total de ésta (Figuras 14A-C y 18A-B). Una posible explicación a este fenómeno podría derivarse de la mayor resistencia que presentan los cardiomiocitos a ciertos estímulos apoptóticos, debido a que estas células tienen niveles comparativamente bajos de Apaf-1. Esto último también explica que la salida del citocromo c desde la mitocondria en el cardiomiocito no tiene las mismas consecuencias observadas en otros tipos celulares (Sanchis et al., 2003; Potts et al., 2005; Martinou and Youle, 2006).

7.4. Fisión mitocondrial y muerte celular

Diferentes estudios han demostrado que la morfología mitocondrial cambia durante la apoptosis, dando como resultado mitocondrias pequeñas, esféricas y más numerosas (Mancini et al., 1997; Desagher and Martinou, 2000; Frank et al., 2001; Pinton et al., 2001; Jagasia et al., 2005). Por ello ha surgido la pregunta acerca de cuál es el mecanismo molecular que regularía este proceso. Frank et al. fueron los primeros en hipotetizar que los componentes básicos de la fisión mitocondrial podrían también participar en la fragmentación de la mitocondria observada durante la apoptosis. Estos investigadores mostraron que Drp-1 se transloca hacia la mitocondria durante la apoptosis dependiente de Bax/Bak y que la inhibición de Drp-1, mediante el mutante DrpK38A, previno eficientemente la fragmentación apoptótica de la mitocondria (Frank et al., 2001). Estos resultados se confirmaron recientemente, en un trabajo del mismo grupo de investigación que muestra que la disminución de la expresión de Fis-1 y Drp-1 también previene la fragmentación de la red durante la apoptosis (Meeusen and Nunnari, 2005). Mediante una estrategia similar, Sugioka et al. inhibieron este mismo evento, activando la expresión de la maquinaria de fusión mitocondrial y demostraron que la sobrexpresión de Fzo1A/B en células Hela evitó la fisión durante la muerte de la célula, sugiriendo que la fisión mitocondrial se modifica durante la apoptosis (Karbowski et al., 2004b). Todos estos datos en su conjunto muestran que la fragmentación mitocondrial que ocurre durante la apoptosis está mediada por un aumento en la fisión del organelo, lo que es seguido por el reclutamiento de Drp-1 hacia la mitocondria y la inhibición de la fusión. Sin embargo, ¿Cómo estos eventos se regulan durante la apoptosis? Actualmente se ha propuesto que la proteína Bax podría participar en este control, basado en que Bax colocaliza con Drp-1 y Mfn-2 en distintos puntos que serán posiblemente los futuros sitios de fisión y corte de la mitocondria después de la inducción de la apoptosis (Karbowski et al., 2002; Neuspiel et al., 2005). Este resultado sugiere que Bax podría estar regulando los cambios morfológicos de la mitocondria durante la apoptosis a través de su interacción con los componentes de la maquinaria de la fisión y fusión mitocondrial. Sin embargo, en la literatura aún no existe evidencia que sostenga una interacción directa entre estas tres proteínas.

Por otra parte, estudios cinéticos han revelado que la mitocondria se fragmenta después de la liberación del citocromo c en las células mamíferas (Gao et al., 2001; Arnoult et al., 2005a). Arnoult et al. encontraron que OPA-1 y otras proteínas de la fisión se liberan desde la mitocondria después de una caída en el potencial de la membrana mitocondrial durante la apoptosis. La liberación de OPA-1 puede entonces explicar la inhibición de la fusión mitocondrial observada durante la apoptosis, dado que células carentes de esta proteína presentan una fuerte fragmentación espontánea de la red mitocondrial (Olichon et al., 2003; Griparic et al., 2004; Lee et al., 2004). Sin embargo, este dato es aún controversial pues también se ha observado que en procesos apotóticos gatillados por activación de receptores de muerte, la fragmentación ocurre en forma previa a la activación de Bax y liberación del citocromo C (Breckenridge et al., 2003). Los resultados encontrados en nuestro trabajo apoyan la idea que la fisión mitocondrial es posterior a la caída en el potencial de la membrana mitocondrial y a la redistribución de las proteínas de la fisión mitocondrial Drp-1 y Fis-1, mientras que la fragmentación ocurría en forma casi paralela a la liberación del citocromo C (Figura 15A-C) y la muerte del cardiomiocito (Figura 17 A-B). Esto último podría deberse a la existencia de una estrecha diferencia temporal entre un proceso y otro: fragmentación de la red y salida de citocromo C, lo que deberá ser aclarado con experimentos diseñados en intervalos más cortos de tiempo. Con estos antecedentes, podemos plantear un modelo similar al propuesto por Arnoult et al., en donde la fisión mitocondrial podría funcionar como un mecanismo de retroalimentación positiva, encargado de amplificar la señal de la caída del potencial mitocondrial y la posterior muerte de la célula (Figura 20).

Quizás uno de los resultados más controversiales de este trabajo fue el obtenido al tratar las células con el AsMfn-2 y C2-ceramida e investigar el efecto sobre la salida del citocromo C desde la mitocondria, el cual ya había sido observado al tratar las células solamente con C₂-ceramida. Este experimento reveló que no hubo una mayor salida de esta proteína desde la mitocondria, tal como se esperaba, sino más bien un aumento en los valores de fluorescencia relativos asociados a la proteína (Figura 19). Este evento puede analizarse desde la perspectiva de que una de las teorías que explican la salida del citocromo C desde la mitocondria, postula que ocurre a través de poros formados tras la activación de Bax. Tal como se mencionó previamente, Bax necesita para su activación la formación de complejos junto a Drp-1 y Mfn-2, lo que implica que posiblemente una de estas dos proteínas participen en el reclutamiento de Bax hacia la mitocondria (Arnoult et al., 2005a). Por lo tanto, el tratamiento con el AsMfn-2 podría impedir la activación de Bax debido a su incapacidad de interactuar con Mfn-2, por lo que sólo se produciría un aumento del citocromo C debido a su salida desde un pool interno de la mitocondria, pero sin la subsecuente salida de la proteína desde el organelo mismo. En particular, Scorrano et al. mostraron que la proteína pro-apoptótica t-Bid no solamente activa a las proteínas Bax/Bak con la siguiente permeabilización de la membrana mitocondrial, sino que también en forma independiente media el remodelado de las crestas mitocondriales, lo cual se requiere para la completa salida del citocromo c desde la mitocondria (Scorrano et al., 2002)

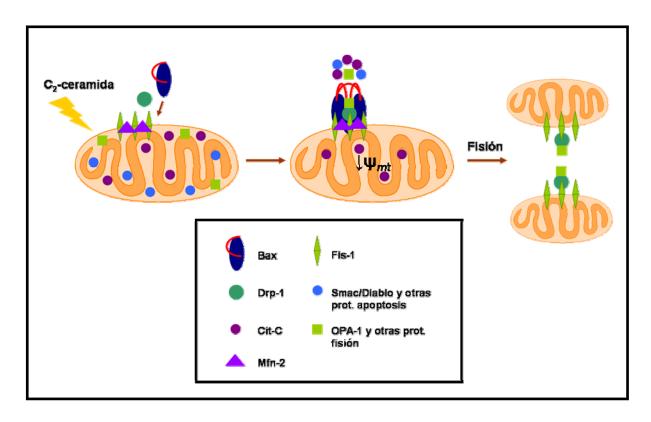


Figura 20. Modelo del mecanismo de activación de la fisión mitocondrial durante la apoptosis y su relación con la pérdida del potencial mitocondrial de membrana (ψmt). Tras un estímulo de muerte, como C₂-ceramida, Drp-1 y Bax se translocan a la membrana mitocondrial, la primera a través de su interacción con Fis-1. Una vez en la mitocondria, Bax forma complejos con Drp-1 y Mfn-2, lo que causa la pérdida del potencial mitocondrial, la reestructuración de las crestas mitocondriales y salida del citocromo C. Como una forma de amplificación de este proceso se produciría la fisión de la red mitocondrial, la cual estaría mediada principalmente por Drp-1.

Finalmente, se ha propuesto un papel alternativo y adicional al proceso de fisión mitocondrial durante los procesos de muerte celular programada. Diversos estudios han mostrado que las mitocondrias son eliminadas durante los procesos de muerte a través de procesos independientes de la actividad de las caspasas, proceso que actualmente conocemos como mitoptosis (Xue et al., 2001; Skulachev, 2002; Tolkovski et al., 2002). Recientemente, Arnoult et al. han descrito que la fisión mitocondrial mediada por Drp-1 promueve la eliminación de las mitocondrias durante la muerte de la célula, mientras que el mutante Drp*K38A*, retarda su desaparición (Arnoult et al., 2005b). Estos resultados sugieren que la fisión mitocondrial podría jugar un rol activo en la autofagia. Sin embargo, el análisis de nuestros datos no reveló relación entre la fragmentación de la red mitocondrial, la muerte gatillada por C₂-ceramida y algún tipo de proceso autofágico, los cuales fueron estudiados mediante colocalización de una marca mitocondrial específica

con un marcador de vacuolas autofágicas como es la proteína GFP-LC3 (Figura 16).

7.5. Perspectivas en el estudio de la fisión/fusión mitocondrial

Este es el primer estudio conocido que investigó la maquinaria de la fisión mitocondrial en el cardiomiocito de rata y su relación con procesos de muerte celular programada. Los datos presentados son en su mayoría descriptivos, pero tienen el mérito de abrir nuevas líneas investigación en la regulación de la dinámica mitocondrial y su relación con los procesos de muerte descritos para este tipo celular. Experimentos posteriores como el análisis de la salida de citocromo C por Western blot, el bloqueo de la fisión mitocondrial mediante un adenovirus que sobrexprese el mutante DrpK38A, así como la sobrexpresión de esta proteína nativa, ayudarán a determinar el papel de la fisión mitocondrial ya sea en la protección o muerte del cardiomiocito. Claramente se requiere nuevas investigaciones que permitan revelar las consecuencias adicionales de la fusión y la fisión mitocondrial y su función celular.

De nuestros resultados surgen dos preguntas críticas:

¿Cómo la morfología de este organelo afecta su función?

¿Cómo las dinámicas mitocondriales afectan la función en forma independiente a la morfología?

La respuesta a estas interrogantes permitirá tener una visión más amplia de la función de este organelo y su relación con la célula completa.

8. CONCLUSIONES

- 1. Drp-1 y Fis-1 se expresaron en el cardiomiocito, con un patrón de distribución común a otros tipos celulares.
- 2. En un orden temporal, C₂-ceramida 40 μM (pero no DH-C₂):
 - Disminuyó el potencial de membrana mitocondrial
 - Aumentó los niveles proteicos de la proteína Fis-1
 - Causó la translocación de Drp-1 desde el citosol hacia las mitocondrias
 - Fragmentó la red mitocondrial en una relación tiempo y concentración dependiente
 - Gatilló la salida del citocromo C desde la mitocondria hacia el citosol
 - Disminuyó la viabilidad celular
- 3. La disminución de los niveles de la proteína de fusión Mfn-2 mediante un adenovirus antisentido:
 - Incrementó los efectos de C₂-ceramida sobre las proteínas de la fisión, morfología mitocondrial y caída del potencial de membrana de este organelo, pero no causó un incremento en la salida del citocromo C desde la mitocondria hacia el citosol inducida por este mismo esfingolípido.

9. BIBLIOGRAFÍA

Akao M, O'Rourke B, Teshima Y, Seharaseyon J, Marban E. Mechanistically distinct steps in the mitochondrial death pathway triggered by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res.* 92:186-194, 2003.

Amchenkova AA, Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP, Zorov DB. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J Cell Biol.* 107: 481-495, 1998.

Arnoult D, Grodet A, Lee YJ, Estaquier J, Blackstone C. Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem.* 280:35742-50, 2005.

Arnoult D, Rismanchi N, Grodet A, Roberts RG, Seeburg DP, Estaquier J, Sheng M, Blackstone C. Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol.* 15:2112-8, 2005b.

Baehrecke EH. Autophagic programmed cell death in Drosophila. *Cell Death Differ.* 10:940-945, 2003.

Barsoum MJ, Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Kushnareva Y, Graber S, Kovacs I, Lee WD, Waggoner J, Cui J, White AD, Bossy B, Martinou JC, Youle RJ, Lipton SA, Ellisman MH, Perkins GA, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J.* 25:3900-3911, 2006.

Basanez G, Sharpe JC, Galanis J, Brandt TB, Hardwick JM, Zimmerberg J. Baxtype apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem.* 277:49360-49365, 2002.

Bielawska AE, Shapiro JP, Jiang L, Melkonyan HS, Piot C, Wolfe CL, Tomei LD, Hannun YA, Umansky SR. Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion. *Am J Pathol.* 151:1257-1263, 1997.

Bladergroen BA, Bussiere M, Klein W, Geelen MJH, van Golde LMG, Houweling M. Inhibition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis in rat-2 fibrobroblasts by cell-permeable ceramides. *Eur J Biochem.* 264:152-160, 1999.

Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol*. 160:1115-1127, 2003.

Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks ZR. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell.* 82:405-414, 1995.

Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol.* 15:706-716, 2003.

Brunk CF. Mitochondrial proliferation during myogenesis. *Exp Cell Res.* 136:305-309, 1981.

Calcerrada MC, Miguel BG, Martin L, Catalan RE, Martinez AM. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in nuclear translocation of protein kinase C f induced by C₂-ceramide in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 514:361-365, 2002.

Capano M, Crompton M. Biphasic translocation of Bax to mitochondria. *Biochem J.* 367:169-178, 2002.

Cerveny KL, Jensen RE. The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol Biol Cell.* 14:4126-4139, 2003.

Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 160:189-200, 2003.

Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem.* 280:26185-26192, 2005a.

Chen H, Chan DC. Emerging functions os mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Gen.* 14:R283-R289, 2005b.

Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptative physiologic response. *FASEB J.* 5:3037-3046, 1991.

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

Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, Ffrench M, Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy*. 1:131-140, 2005.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 116:205-219, 2004.

Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet*. 109:584-591, 2001.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10:369-377, 2000.

Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 16:663-669, 2004.

Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem.* 134:333-344, 2003.

Farsad K, Ringstad N, Takei K, Floyd SR, Rose K, De Camilli P. Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol.* 155:193-200, 2001.

Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell.* 1:515-525, 2001.

Gao W, Pu Y, Luo KQ, Chang DC. Temporal relationship between cytochrome c release and mitochondrial swelling during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *J Cell Sci.* 114:2855-62, 2001.

Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J.* 24:1546-1556, 2005.

Griffin EE, Graumann J, Chan DC. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol.* 170:237-248, 2005.

Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ, van der Bliek AM. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem.* 279:18792-18798, 2004.

Goglia F, Moreno M, Lanni A: Action of thyroid hormones at the cellular level. The mitochondrial target. *FEBS Lett.* 452:115-120, 1999.

Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 23:2891-2906, 2004.

Hales KG, Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell.* 90:121-129, 1997.

Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* 10:73-80, 2000.

Herlan M, Vogel F, Bornhovd C, Neupert W, Reichert AS. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem.* 278: 27781-27788, 2003.

Herlan M, Bornhovd C, Hell K, Neupert W, Reichert AS. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol.* 165:167-173, 2004.

Hermann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J, Shaw JM. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol.* 143:359-373, 1998.

Hinshaw JE. Dinamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:483-519. 2000.

Ingwall JS, Weiss RG. Is the failing heart energy starved?: On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res.* 95:135-145, 2004.

Ishihara N, Jofuku A, Eura Y, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:891-898, 2003.

Ishihara N, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase. *J Cell Sci.* 14:2342-2356, 2004.

Jaattela M, Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol.* 4:416-423, 2003.

Jaffrezou JP, Maestre N, de Mas-Mansat V, Bezombes C, Levade T, Laurent G. Positive feedback control of neutral sphingomyelinase activity by ceramide. *FASEB J.* 12:999-1006, 1998.

Jagasia R, Grote P, Westermann B, Conradt B. DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans. Nature.* 433:754-760, 2005.

James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem.* 278:36373-36379, 2003.

Jaroszewski L, Li W, Godzik A. In search of more accurate alignments in the twilight zone. *Protein Sci.* 11:1702-1713, 2002.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19:5720-5728, 2000.

Kawahara H, Houdou S, Inoue T. Scanning electron microscopic observations on muscle cells of experimental mitochondrial myopathy produced by 2, 4-dinitrophenol. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 23:397-403, 1991.

Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and MFN2 during apoptosis. *J Cell Biol*. 159:931-938, 2002.

Karbowski M, Youle RJ. Dynamics of mitochondrial morphology in healty cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10:870-880, 2003.

Karbowski M, Jeong SY, Youle RJ. Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol.* 166:1027-1039, 2004a.

Karbowski M, Arnoult D, Chen H, Chan DC, Smith CL, Youle RJ. Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol.* 164:493-499, 2004b.

Kim TH, Zhao Y, Ding WX, Shin JN, He X, Seo YW, Chen J, Rabinowich H, Amoscato AA, Yin XM. Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release. *Mol Biol Cell*. 15:3061-3072, 2004.

Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest.* 98:2854-2865, 1996.

Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*. 305:858-862, 2004.

Labrousse AM, Zapaterra M, Rube DA, van der Bliek AM. *C.elegans* dynamin-related protein *drp-1* controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell.* 4:815-826, 1999.

Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*. 15:5001-5011, 2004.

Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell*. 13, 4343-4354, 2002.

Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 6:463-477, 2004.

Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene*. 23:2766-2773, 2004.

Maldonado C, Eisner V, Gálvez A, Ulloa JA, Criollo A, Ocaranza P, Eltit JM, Morales MP, Quiroga C, Campos X, Chiong M, Sapag-Hagar M, Lavandero S. Mecanismos moleculares en la apoptosis del cardiomiocito y sus proyecciones patológicas y terapéuticas. *Rev Chil Cardiol.* 20:351-382, 2001.

Mancini M, Anderson BO, Caldwell E, Sedghinasab M, Paty PB, Hockenbery DM. Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *J Cell Biol*. 138:449-469, 1997.

Martinou JC, Youle RJ. Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ*. 13:1291-5, 2006.

McMaster CR. Lipid metabolism and vesicle trafficking: more than just greasing the transport machinery. *Biochem Cell Biol.* 79:681-692, 2001.

McQuibban GA, Saurya S, Freeman M. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature*. 423:537-541,2003.

Meeusen SL, Nunnari J. How mitochondria fuse. *Curr Opin Cell Biol.* 17:389-394, 2005.

Moyes CD, Mathieu-Costello OA, Tsuchiya N, Filburn C, Hansford RG. Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am J Physiol.* 272:C1345-C1351, 1997.

Muller-Hocker J, Pongratz D, Hubner G. Activation of mitochondrial ATPase as evidence of loosely coupled oxidative phosphorylation in various skeletal muscle disorders. A histochemical fine-structural study. *J Neurol Sci.* 74:199-213, 1986.

Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, McBride H. Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem.* 280:25060-70, 2005.

Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon S-H, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol.* 153:1265-1276, 2001.

Ogretmen B, Pettus BJ, Rossi MJ, Wood R, Usta J, Szulc Z, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA. Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. *J Biol Chem.* 277:12960-12969, 2002.

Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Brichese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* 523:171-176, 2002.

Olichon, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G. Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem.* 278:7743-7746, 2003.

Ono T, Isobe K, Nakada K, Hayashi JI. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet*. 28:272-275, 2001.

Parone PA, Martinou JC. Mitochondrial fission and apoptosis: an ongoing trial. *Biochim Biophys Acta*. 1763:522-30, 2006.

Perry DK. The role of de novo ceramide synthesis in chemotherapy induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.* 905:91-96, 2000.

Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. The Ca2+concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J.* 20:2690-2701, 2001.

Potts MB, Vaughn AE, McDonough H, Patterson C, Deshmukh M. Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP. *J Cell Biol.* 171:925-30, 2005.

Ramos B, Salido GM, Campo ML, Claro E. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis precedes apoptosis induced by C2-ceramide: protection by exogenous phosphatidylcholine. *Neuroreport.* 11:3103-3108, 2000.

Ramos B, Mouedden ME, Claro E, Jackowski S. Inhibition of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase by C2-ceramide and its relationship to apoptosis. *Mol Pharmacol.* 62:1068-1075, 2002.

Ringstad N, Gad H, Low P, Di Paolo G, Brodin L, Shupliakov O, De Carmilli P. Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathring-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron.* 24:143-154, 1999.

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

Rube DA, van der Bliek AM. Mitochondrial morphology is dynamic and varied. *Mol Cell Biochem*. 256:331-339, 2004.

Sanchis D, Mayorga M, Ballester M, Comella JX. Lack of Apaf-1 expression confers resistance to cytochrome c-driven apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Death Differ*. 10:977-86, 2003.

Sanger N, Strohmeier R, Kaufmann M, Kuhl H. Cell cycle-related expression and ligand binding of peripheral benzodiazepine receptor in human breast cancer cell lines. *Eur J Cancer*. 36:2157-2163, 2000.

Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci.* 114:867-874, 2001.

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

Scheffler IE. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion*. 1:3-31, 2001.

Schmidt A, Wolde M, Thielt C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Soling HD. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophophatidic acid. *Nature*. 401:133-141, 1999.

Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*. 2:55-67, 2002.

Sesaki H, Jensen RE. Division vs. fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol.* 147:699-706, 1999.

Sesaki H, Southard SM, Hobbs AE, Jensen RE. Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1pdependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem Biophys Res Commun.* 308:276-283, 2003.

Siskind LJ, Colombini M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J Biol Chem.* 275:38640-38644, 2000.

Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion*. 6:118-125, 2006.

Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power transmitting cables. *Trends Biochem Sci.* 26:23-29, 2001.

Skulachev VP. Programmed death phenomena: from organelle to organism. *Ann N Y Acad Sci.* 959:214-237, 2002.

Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 12:224-256, 2001.

Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacin M, Zorzano A. Evidence for a Mitochondrial Regulatory Pathway Defined by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-{gamma} Coactivator-1{alpha}, Estrogen-Related Receptor-{alpha}, and Mitofusin 2. *Diabetes*. 55:1783-1791, 2006.

Sugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem.* 279:52726-52734, 2004.

Szabadkai G, Simoni AM, Chami M, Wieckowski MR, Youle RJ, Rizzuto R. Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca2+ waves and protects against Ca2+-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 16:59-68, 2004.

Terman A, Dalen H, Eaton JW, Neuzil J, Brunk UT. Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: the role of autophagocytosis. *Exp Gerontol*. 38:863-876, 2003.

Terman A, Dalen H, Eaton JW, Neuzil J, Brunk UT. Aging of cardiac myocytes in culture: oxidative stress, lipofuscin accumulation, and mitochondrial turnover. *Ann N Y Acad Sci.* 1019:70-77, 2004.

Tieu Q, Okreglak V, Naylor K, Nunnari J. The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol.* 158:445-452, 2002.

Tolkovsky AM, Xue L, Fletcher GC, Borutaite V. Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie*. 84:233-240, 2002.

Valentijn AJ, Metcalfe AD, Kott J, Streuli CH, Gilmore AP. Spatial and temporal changes in Bax subcellular localization during anoikis. *J Cell Biol.* 162:599-612, 2003.

Van Blitterswijk WJ, Van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J*. 369:199-211. 2003.

Van der Luit AH, Budde M, Ruurs P, Verheij M, van Blitterswijk WJ. Alkyllysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis. *J Biol Chem.* 277, 39541-39547, 2002.

Vorobjev IA, Zorov DB. Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum. *FEBS Lett.* 163:311-314, 1983.

Wang J, Zhen L, Klug MG, Wood D, Wu X, Mizrahi J. Involvement of caspase 3and 8-like proteases in ceramide-induced apoptosis of cardiomyocytes. *J Card Fail*. 6:243-249, 2000.

Westermann B. Merging mitochondria matters. Cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO reports*. 3:527-531, 2002.

Wong ED, Wagner JA, Scott SV, Okreglak V, Holewinske TJ, Cassidy-Stone A, Nunnari J. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol.* 160:303-311, 2003.

Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol.* 11:361-365, 2001.

Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol.* 23:5409–5420, 2003.

Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apotosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:657-663, 2005.