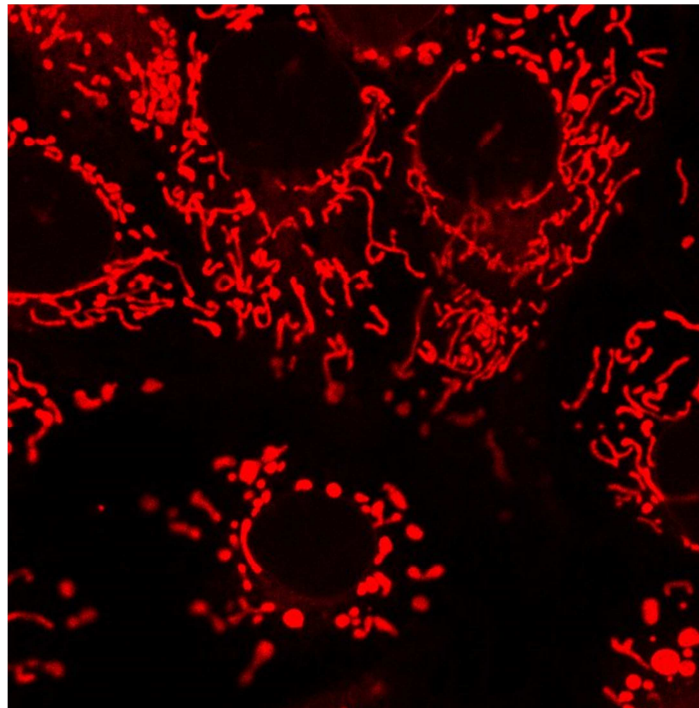


## Treball de Fi de Grau

# *Anàlisi de l'efecte del Honokiol sobre la morfologia i funció mitocondrials*



Óscar Baeza Francisoud

**Grau en Biotecnologia**

Tutor: David Sebastián Muñoz

Avaladora: Susanna Bodoy Salvans

Vic, Juny de 2019



## **Agraïments**

Primer de tot, agrair al Dr. Antonio Zorzano l'oportunitat de realitzar el meu TFG en el seu grup, obrint la porta a un desconegut a la realitat científica d'avui en dia. Donar les gràcies també al Dr. David Sebastián, per tot el seu treball, paciència, dedicació i ajuda a dur a bon terme aquest projecte. Sense la seva implicació no hagués estat possible fer res d'això. A la Dr. Susanna Bodoy, per confiar en mi i recomanar-me dins el laboratori. Sense la seva passió com a professora tampoc estaria avui aquí.

Gràcies a tots els companys del laboratori que han hagut de suportar les meves preguntes, com la Maria Isabel Hernández, Andrea Irazoki, Isabel Gordaliza, Andrea Rodgers, Arnau Vizcarra, i tots els companys del laboratori Zorzano/Palacín. El bon ambient que es respira al laboratori és gràcies a vosaltres, a la vostra col·laboració i simpatia amb tothom.

Agrair també la col·laboració del grup de la Dr. Antònia Ribes, del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic per cedir-nos els fibroblasts humans que hem utilitzat. Als serveis de Citometria de la UB i de Microscòpia Digital Avançada del IRB, que m'han aconsellat i guiat a l'hora de fer qualsevol mesura.

El suport de tots ells ha fet que aquests quatre mesos que he passat fent el TFG al laboratori hagin passat molt ràpidament. Aquesta estada m'ha ajudat a veure el treball científic des de dins, ben a prop.

Finalment, agrair el suport i ajuda incondicional de la meva família, mare, pare i el meu germà, que han forjat com sóc avui. Gràcies al seu suport he arribat onestic.

## RESUM TREBALL FINAL DE GRAU GRAU EN BIOTECNOLOGIA

**Títol:** Anàlisi de l'efecte del Honokiol sobre la morfologia i funció mitocondrials

**Paraules clau:** dinàmica mitocondrial, Honokiol, Charcot-Marie-Tooth, respiració mitocondrial, potencial de membrana, producció de ROS, Mfn2

**Autor:** Óscar Baeza Francisoud

**Tutors:** Dr. David Sebastián (IRB Barcelona) i Dr. Susanna Bodoy (UVic)

**Data:** Juny de 2019

En aquest *Treball de Final de Grau* s'exposen els resultats de l'anàlisi de l'efecte del Honokiol sobre la morfologia i funcionalitat mitocondrials en cèl·lules *Mouse Embryonic Fibroblasts* i en Fibroblasts Humans extrets de pacients amb mutacions en Mfn2. A partir de les dades resultants d'estudis previs del grup del Dr. Zorzano, la hipòtesi de partida del present *Treball de Final de Grau* és que un tractament amb Honokiol milloraria la morfologia i la funcionalitat de les xarxes mitocondrials presents en les cèl·lules estudiades.

Així doncs, l'objectiu principal del projecte és la determinació de l'efecte provocat per una incubació de 24 h amb Honokiol sobre la dinàmica mitocondrial. L'anàlisi de la morfologia s'ha dut a terme amb microscòpia confocal i tenyint els mitocondris amb sondes fluorogèniques. Els anàlisis funcionals han consistit a realitzar citometria de flux, incubant les cèl·lules amb sondes per mesurar la massa, potencial de membrana i producció de ROS mitocondrial. També s'ha avaluat el consum d'oxigen dels fibroblasts mitjançant el *XF24 Extracellular Flux Analyzer* de *Seahorse Bioscience*. Finalment, s'han realitzat *Western Blots* per tal d'avaluar possibles canvis en l'expressió proteica.

Els resultats del projecte han identificat la Mfn2 com a mitjancera de l'efecte elongador dels mitocondris provocat pel Hnk. Aquest tractament no ha afectat ni la massa ni el potencial de membrana de les cèl·lules MEF. S'ha detectat una tendència a disminuir l'expressió de la proteïna de fissió DRP1 a causa d'aquest tractament. En relació als fibroblasts, s'observa una tendència a augmentar l'elongació mitocondrial. La massa i el potencial romanen sense canvis mentre que és reduïda la producció de ROS. La respiració és minvada pel Hnk en el cas dels fibroblasts 5339 i la fa més eficient en el cas dels 5354. Respecte a l'expressió proteica, augmenta la de OPA1 en els 5339 mantenint la resta constant.

Aquests resultats poden ser un punt de partida per altres anàlisis destinats a confirmar i determinar el mecanisme d'acció del Honokiol, i a estudiar a escala biològica i molecular la dinàmica mitocondrial relacionada amb diverses patologies, així com a la recerca de noves molècules activadores d'aquesta.

**DEGREE FINAL PROJECT SUMMARY**  
**DEGREE IN BIOTECHNOLOGY**

**Title:** *Analysis of the effect of Honokiol on mitochondrial morphology and function*

**Keywords:** *mitochondrial dynamics, Honokiol, Charcot-Marie-Tooth, mitochondrial respiration, membrane potential, ROS production, Mfn2*

**Author:** Óscar Baeza Francisoud

**Tutors:** Dr. David Sebastián (IRB Barcelona) and Dr. Susanna Bodoy (UVic)

**Date:** June 2019

In this study we present the results of the analysis of the effect of Honokiol on the morphology and mitochondrial functionality of *Mouse Embryonic Fibroblasts* and Human Fibroblasts from patients with mutations in Mfn2. Based on data from previous studies of Dr. Zorzano's group, the starting hypothesis of this study is that the treatment with Honokiol would improve the morphology and functionality of the mitochondrial networks present in the cells studied.

Therefore, the main objective of this project is the determination of the effect caused by a 24 h incubation with Honokiol on mitochondrial dynamics. The analysis of morphology has been carried out with confocal microscopy staining the mitochondria with fluorescence probes. Functional analysis consisted in flow cytometry, incubating the cells with probes to measure the mass, membrane potential and production of mitochondrial ROS. The consumption of oxygen of fibroblasts has also been evaluated using the *XF24 Extracellular Flux Analyzer* of *Seahorse Bioscience*. Finally, Western Blots have been performed to evaluate possible changes in protein expression.

As a result, we have identified Mfn2 as an intermediary of the elongating of mitochondria caused by Hnk. This treatment has not affected the mass or membrane potential of MEF cells. There has been a tendency to decrease the expression of the fission protein DRP1 due to this treatment. In fibroblasts, there is a tendency to increase mitochondrial elongation. Mass and potential remain unchanged while ROS production is reduced. Mitochondrial respiration is decreased by Hnk in the case of fibroblasts 5339, increasing the efficiency in fibroblasts type 5354. Regarding protein expression, OPA1 increases in 5339 while maintaining the rest constant.

These results can be a starting point for more research, intended to confirm and determine the mechanism of action of Honokiol, and to study at the biological and molecular level the mitochondrial dynamics related to different pathologies. More research is needed in order to find molecules capable of improving the mitochondrial function.

### **Llistat d'Abreviatures**

Tot i que aquest treball ha estat redactat en català, el significat de les abreviatures següents s'ha indicat en anglès, donat que l'ordre de les lletres prové de l'expressió anglesa.

**ADOA:** Autosomal Dominant Optic Atrophy

**ATP:** Adenosine triphosphate

**ADP:** Adenosine Diphosphate

**BCA:** Bicinchoninic acid assay

**BSA:** Bovine Serum Albumin

**CCCP:** Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone

**DAPI:** 4',6-Diamidino-2-Phenylindole

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO:** Dimetilsulfoxide

**DNA:** Deoxyribonucleic acid

**DTT:** Dithiothreitol

**ECAR:** Extracellular Acidification Rate

**ER:** Endoplasmatic Reticulum

**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid

**FBS:** Fetal Bovine Serum

**FADH:** Flavin Adenine Dinucleotide

**GED:** GTPase effector domain

**GTP:** Guanosine triphosphate

**Hepes:** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

**HR:** Heptad repeats

**HRP:** Horseradish Peroxidase

**IMM:** Inner Mitochondrial Membrane

**KO:** Knock Out

**LSB:** Laemmly Sample Buffer

**MEF:** Mouse Embryonic Fibroblasts

**MFF:** Mitochondrial fission factor

**Mfn1:** Mitofusin 1

**Mfn2:** Mitofusin 2

**MID 49:** Mitochondrial Dynamics Protein of 49 kDa

**MID51/MIEF1:** Mitochondrial Dynamics protein of 51 kDa/ Mitochondrial elongation factor 1

**MSL:** Multiple symmetric lipomatosis

**MTS:** Mitochondrial targeting sequence

**NADH:** Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form

**OCR:** Oxygen Consumption Rate

**OMM:** Outer Mitochondrial Membrane

**OPA1:** Optic Atrophy Protein 1

**OXPHOS:** Oxidative phosphorylation

**O/N:** Over Night

**P/S:** Penicillin/Streptomycin

**PBS:** Phosphate-buffered saline

**ROS:** Reactive Oxygen Species

**RNA:** Ribonucleic acid

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

**TMRM:** Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate

**TPR:** Tetratricopeptide domain

**WT:** Wild Type

## Índex

<b>1.</b>	<b>Introducció .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Els mitocondris .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1.</b>	<b>La membrana exterior .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2.</b>	<b>L'espai intermembranós .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.3.</b>	<b>La membrana interna .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.4.</b>	<b>Les crestes mitocondrials .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.5.</b>	<b>La matriu mitocondrial .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.</b>	<b>La cadena de transport d'electrons.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1.</b>	<b>Producció de ROS .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.</b>	<b>Dinàmica mitocondrial .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.1.</b>	<b>Fusió .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.2.</b>	<b>Fissió.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4.</b>	<b>Dinàmica i funció mitocondrial .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5.</b>	<b>Dinàmica mitocondrial i patologies.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5.1.</b>	<b>Charcot-Marie-Tooth .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6.</b>	<b>La dinàmica mitocondrial com a diana farmacològica.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6.1.</b>	<b>Estudis previs .....</b>	<b>11</b>
<b>1.6.2.</b>	<b>Honokiol .....</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>Objectius .....</b>	<b>13</b>
<b>3.</b>	<b>Materials i Mètodes .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.</b>	<b>Línies cel·lulars .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.</b>	<b>Microscòpia confocal .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3.</b>	<b>Citometria de fluxe .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4.</b>	<b>Tècniques de Western Blot: obtenció d'extractes, quantificació proteica i anàlisi per Western Blot .....</b>	<b>16</b>
<b>3.5.</b>	<b>Assaig de consum d'oxigen d'un cultiu cel·lular (XF24 Extracellular Flux Assay, Seahorse) .....</b>	<b>19</b>
<b>3.6.</b>	<b>Anàlisi estadístic .....</b>	<b>20</b>
<b>4.</b>	<b>Resultats.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.</b>	<b>Anàlisi de l'efecte del Honokiol sobre la morfologia mitocondrial en cèl·lules MEF21</b>	
<b>4.2.</b>	<b>Anàlisi de la massa mitocondrial i el potencial de membrana en cèl·lules MEF.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3.</b>	<b>Expressió de proteïnes de fusió i fissió en cèl·lules MEF .....</b>	<b>25</b>



4.4.	Anàlisi de l'efecte del Honokiol sobre la morfologia mitocondrial en fibroblasts humans .....	26
4.5.	Anàlisi de la massa mitocondrial, potencial de membrana i producció de ROS en fibroblasts humans .....	28
4.6.	Efecte del Honokiol sobre la respiració mitocondrial en fibroblasts humans .....	29
4.7.	Expressió de proteïnes de fusió i fissió en fibroblasts humans .....	30
5.	Discussió.....	30
6.	Conclusions.....	36
7.	Bibliografia .....	37
Annex A: Descripció Detallada del Material i Mètodes.....		41
A1.	Tècniques de cultiu cel·lular .....	41
A1.1	Descongelació d'alíquotes cel·lulars.....	41
A1.2	Descongelació d'alíquotes cel·lulars de cultius primaris de fibroblasts .....	42
A1.3	Congelació d'alíquotes cel·lulars.....	42
A1.4	Tripsinització, dilució de cèl·lules i comptatge cel·lular .....	44
A2.	Microscopia Confocal.....	47
A3.	Citometria de Flux.....	50
A3.1	Sonda Tetrametilrodamina (TMRM) (#M20036) d'Invitrogen:.....	50
A3.2	Sonda MitoTracker Deep Red (#M22426) d'Invitrogen: .....	51
A3.3	Sonda CellROX Red (# C10422) d'Invitrogen: .....	51
A4.	Tècniques de Western Blot.....	54
A4.1	Generació d'extractes cel·lulars totals o lisats totals.....	54
A4.2	Quantificació proteica dels extractes mitjançant BCA.....	55
A4.3	Western Blot: preparació dels gels, electroforesi, transferència, immunodetecció, revelatge i quantificació.....	56
A4.4	Stripping .....	65
A.5	Assaig de consum d'oxigen d'un cultiu cel·lular ( <i>XF24 Extracellular Flux Assay, Seahorse</i> ) .....	66

## 1. Introducció

### 1.1. Els mitocondris

Els mitocondris (plural de mitocondri) són orgànuls amb una doble membrana trobats a la totalitat d'organismes eucariotes. La paraula mitocòndria prové del grec *mitos*, "fil", i *chondrion*, "grànul" <sup>1</sup>. La funció principal d'aquests orgànuls és la generació d'adenosina trifosfat (ATP), molècula utilitzada per les cèl·lules com a font d'energia química <sup>2</sup>. Aquesta creació d'energia es fa principalment mitjançant la fosforilació oxidativa, per transformar el poder reductor aconseguit mitjançant la oxidació de diverses substàncies derivades de la glucosa, com piruvat i NADH, en ATP, la molècula d'intercanvi energètic utilitzada per les nostres cèl·lules. Aquesta primera via és coneguda com respiració aeròbica, i és dependent de la disponibilitat d'oxigen a nivell cel·lular. Quant l'oxigen és limitat, els productes de la glicòlisi són metabolitzats per fermentació anaeròbica, independentment de la xarxa mitocondrial. La seva estructura compta amb cinc parts diferenciades, com a resultat de la organització de les dues membranes d'aquests orgànuls, explicades a continuació.

#### 1.1.1. La membrana exterior

També anomenada OMM, delimita l'exterior de l'orgànul, conté gran quantitat de proteïnes transmembrana indispensables per al seu funcionament, com ara les porines o els canals d'anions dependents del voltatge. Aquests segons són els responsables del transport primari de nucleòtids, ions i metabòlits diversos entre el citosol y l'espai intermembranal del mitocondri <sup>3</sup>. Aquesta membrana es pot associar amb la membrana del reticle endoplasmàtic. Aquesta relació és molt important en les vies de senyalització del calci estant involucrada també en la transferència lipídica entre el ER i la mitocòndria <sup>4</sup>. Estudis recents han trobat relacions entre una disfunció en aquesta comunicació amb diverses malalties com l'Alzheimer, el Parkinson, alguns tipus de càncers o l'esteatosi hepàtica no alcohòlica <sup>5-9</sup>.

Aquesta membrana també conté enzims encarregats de diverses funcions, com ara l'elongació d'àcids grassos, l'oxidació de l'adrenalina o la degradació del triptòfan. Un trencament d'aquesta membrana més exterior allibera tot el contingut proteic de l'espai intermembranós al citosol, cosa que provocarà la mort cel·lular <sup>10</sup>.

#### 1.1.2. L'espai intermembranós

És l'espai trobat entre la membrana exterior i la interior, també conegut com a espai perimitocondrial. Degut a la permeabilitat de la membrana exterior a molècules petites, com ara sucres i ions són les mateixes en aquest espai que en el citosol. En canvi, la concentració de molècules grans com poden ser proteïnes, depèn de que aquestes estiguin marcades amb una senyal, sinó, no seran transportades a aquest

espai. Degut a això, la composició en molècules grans difereix molt de la trobada en el citosol de la mateixa cèl·lula.

### 1.1.3. La membrana interna

També anomenada IMM, conté més de 151 polipèptids diferents, amb un ratio de 1 proteïna per 15 fosfolípids. Aquestes proteïnes tenen unes funcions vitals per la cèl·lula i l'organisme en conjunt, com ara dur a terme les reaccions de la fosforilació oxidativa, generar ATP a la matriu, regular el transport de metabòlits dins i fora de la membrana, importar proteïnes diverses, etc.

Aquesta membrana és on es localitzen aproximadament una cinquena part de les proteïnes totals d'un mitocondri. Al contrari de la membrana exterior, aquesta no conté porines, i és altament impermeable a tot tipus de molècules. Gairebé tots els ions i molècules necessiten de transportadors especials per tal de travessar aquesta membrana<sup>11</sup>.

### 1.1.4. Les crestes mitocondrials

Són invaginacions i plegaments de la membrana interna. Aquestes crestes estan unides per tal de donar aquesta forma per *crista junctions*, que a la vegada separen aquestes crestes de la membrana interna, uns 20-50 nm<sup>12</sup>. La impermeabilitat d'aquesta membrana interna juntament amb la morfologia de les crestes permet fer la fosforilació oxidativa, de la qual explico el funcionament més endavant<sup>13</sup>.

### 1.1.5. La matriu mitocondrial

És l'espai contingut dins la membrana interna mitocondrial, conté dos terços de la proteïna total d'un mitocondri. Aquí és on localitzem, entre altres, enzims d'oxidació, ribosomes mitocondrials, tRNA, i multitud de còpies del genoma mitocondrial de DNA. Les funcions més importants dels enzims que podem trobar aquí inclouen als responsables de l'oxidació del piruvat i els àcids grassos, així com el del Cicle de Krebs<sup>14</sup>.

## 1.2. La cadena de transport d'electrons

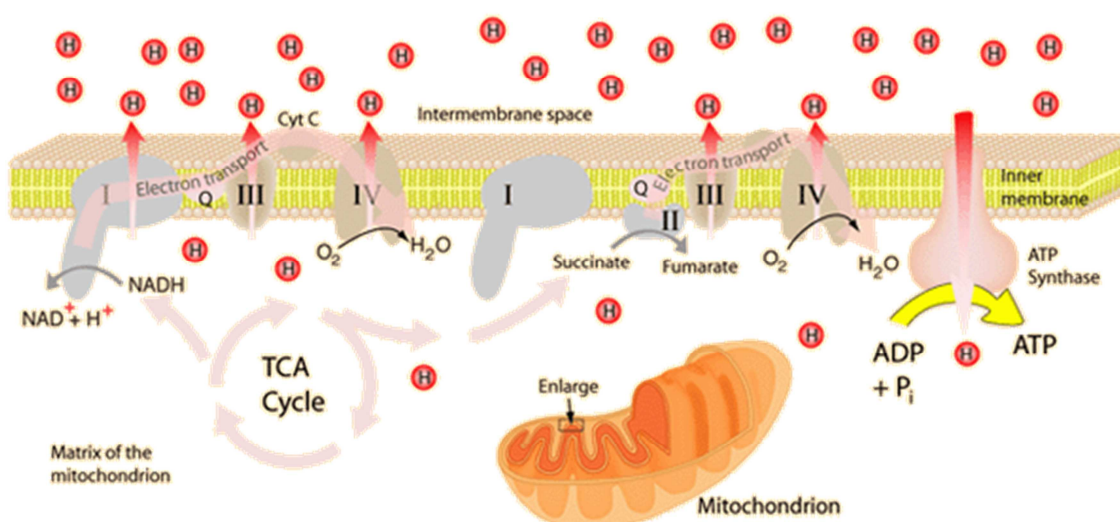
És el procés més important dut a terme en el mitocondri, generant la majoria d'ATP disponible. El seu estat es pot avaluar a través del potencial de membrana, el consum d'oxigen i la producció de espècies reactives d'oxigen (ROS). Aquests dos primers estan estretament relacionats amb el procés de fosforilació oxidativa explicat tot seguit.

La cadena de transport d'electrons és formada per un conjunt de proteïnes integrades en la IMM. La seva funció consisteix en rebre electrons de molècules amb poder reductor, com el NADH i el FADH i moure'ls d'un component de la cadena al següent mitjançant reaccions redox, pas a pas produint un gradient de protons a través de la

membrana. La majoria d'aquestes molècules amb poder reductor s'han produït en etapes prèvies del metabolisme cel·lular, com son la glucòlisi, l'oxidació del piruvat o el cicle de Krebs. El NADH cedeix dos electrons al complex I de la cadena, a que els transfereix al transportador d'electrons ubiquinona, impulsant al fer-ho protons en contra del gradient cap a l'espai intermembranós.

Similarment, el FADH diposita un parell d'electrons en el complex II, que després són també transferits a la ubiquinona. D'aquest punt en endavant, els electrons vinguin d'on vinguin tenen el mateix camí. La ubiquinona reduïda els entrega al complex III, que per tal de seguir expulsant protons contra gradient mou els electrons fins al citocrom C, també un transportador mòbil. Finalment, els electrons acaben la seva travessia per la membrana al complex IV, on a més a més d'impulsar els últims protons a l'espai intermembranós, son donats a la molècula acceptora final: l'oxigen. Aquesta quan és reduïda completament reacciona amb protons de la matriu per formar dues molècules d'aigua, creant encara més gradient.

Els complexos I, III i IV són capaços de transportar els protons contra el gradient gràcies a que aquests es mouen dels membres menys àvids per carrega negativa cap als que ho son més. Aquestes reaccions redox, al estrat afavorides termodinàmicament alliberen energia, la qual els complexos utilitzen per a impulsar els protons. Aquest impuls de protons al llarg del temps provoca un gradient de potencial electroquímic, causat per la distribució desigual dels protons, que és aprofitat pel complex V, també anomenat l'ATP sintasa. Aquest complex permet que els protons traspassin la membrana només per aquest punt, que aprofita l'energia del moviment a favor del gradient d'aquest ions per a fosforilar ADP a ATP, procés anomenat quimiosmosi. Una representació gràfica completa d'aquest procés es pot veure en la Fig. 1.



**Figura 1.** Representació de la cadena de transport d'electrons dins el mitocondri. Adaptat de Karp et al. 2008

La mesura del potencial de membrana ens donarà una idea del bon o dolent funcionament de cada un dels complexos que formen aquesta cadena. Quant major sigui aquest potencial, millor funcionament d'aquests podem suposar. La mesura del consum d'oxigen també ens proporcionarà una mesura de l'estat d'aquesta cadena, especialment com de relacionat es troba aquest amb la síntesi d'ATP. Això serà determinat tractant les cèl·lules amb diferents inhibidors dels complexos, per tant indicant la part del potencial que realment és aprofitat per sintetitzar ATP i quant d'aquest es perdut.

### **1.2.1. Producció de ROS**

Donada la importància de les mitocòndries en el metabolisme oxidatiu, és evident que tenen un paper fonamental en la producció de ROS a la cèl·lula. L'espècie més produïda en aquest orgànuł és l'ió superòxid ( $O_2^-$ ), causat pel fet de que és el que té el procés de síntesi més senzill: només amb un electró circulant per la cadena i que sigui transferit a una molècula d'oxigen.

Aquesta formació de superòxid es veu incrementada dràsticament en moments de desacceleració o de frenada completa al flux d'electrons per la cadena. Això pot succeir de dues formes diferents<sup>15</sup>: quan el potencial de membrana és massa alt, per tant existeix una gran quantitat d'ubiquinones reduïdes que no poden passar els electrons més cap endavant de la cadena. Això provoca un transport cap enrere d'electrons fins el complex I, on aquest excés s'entrega a molècules d'oxigen creant superòxid. La segona manera consisteix en un augment de la quantitat de NADH, en la que la síntesi es més ràpida que la seva consumició, cosa que fa que la relació NADH/NAD<sup>+</sup> augmenti, acumulant electrons al complex I, i en excés alguns d'aquests s'escapen i acaben units a una molècula d'oxigen, creant altre cop superòxid. El complex III també pot ser un creador de superòxid, però sempre en quantitats molt inferiors a les generades per el complex I<sup>15</sup>. Un cop s'ha format aquest superòxid, pot patir una dismutació espontània o catalitzada que genera peròxid d'hidrogen, la segona espècie d'oxigen reactiva més abundant en el cos humà.

Amb aquest coneixement podem afirmar que un mal funcionament d'aquesta cadena de transport ja sigui per mutacions dels complexos, danys en la membrana, els seus components, etc, augmentarà el nivell de ROS trobat a la cèl·lula. És per això que la mesura de ROS també ens dona informació sobre l'estat mitocondrial.

### **1.3. Dinàmica mitocondrial**

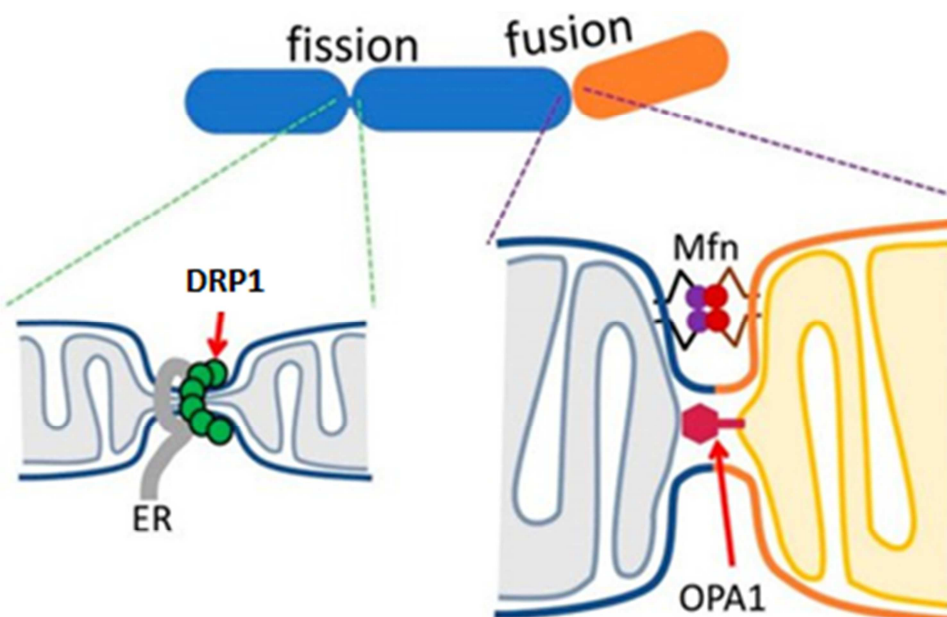
Els mitocondris fins fa pocs anys es consideraven uns orgànuls aïllats i sense relacions entre ells, però a mitjans dels anys 80 es va veure que en realitat es troben dins les cèl·lules formant una xarxa molt complexa, interconnectada a diferents nivells i amb molt dinamisme depenent de les condicions en les que es trobi la cèl·lula que ocupa. Moltes vegades formen un complex tubular dins la cèl·lula tot interactuant amb el

citoesquelet <sup>16-18</sup>. Aquest dinamisme no és només important a l'hora de determinar la forma dels complexos mitocondrials, sinó que també regula el moviment d'aquests orgànuls junt al citoesquelet cel·lular. Aquesta associació pot determinar la morfologia d'aquests primers <sup>19</sup>. Tot aquest dinamisme i canvi s'anomena dinàmica mitocondrial, i és regulada per processos de fusió i fissió <sup>20</sup>.

Ambdós mecanismes són essencials per a la supervivència cel·lular, estan estretament relacionats i qualsevol pertorbació en el seu equilibri pot desencadenar alteracions en el metabolisme oxidatiu, com una menor eficiència en el consum d'oxigen o més producció de ROS.

Els elements centrals dels processos de fusió i fissió són grans enzims hidrolitzants de GTP, pertanyents a la superfamília de les dinamines. Aquests dos processos actuen de manera contrària, un augment de la fusió comporta un allargament de les mitocondries mentre que un augment de la fissió provoca una fragmentació d'aquests. Un major allargament d'aquests s'ha associat amb una major i més eficient producció d'energia cel·lular <sup>21</sup>. Que es faci un procés o un altre depèn principalment de l'estat fisiològic cel·lular. S'ha hipotetitzat per part d'alguns investigadors, que quan falta energia en algun lloc de la cèl·lula, si les mitocondries s'allarguen i uneixen poden generar energia allà on era necessària gràcies a una funció de "cablejat elèctric", que permet que el substrat disponible en una part llunyana del citoplasma produeixi una diferència de potencial que s'estengui al llarg de la membrana fins a aquests llocs on hi fa falta, garantint un aport energètic global <sup>22</sup>. Aquesta és la raó per la qual en estats fisiològics en la qual la disponibilitat de nutrients es baixa s'estimula la fusió i quan aquesta s'eleva s'estimula el procés contrari, la fissió.

Tots aquests processos estan regulats per unes proteïnes de dinàmica mitocondrial, explicades a continuació. (veure Fig. 2)

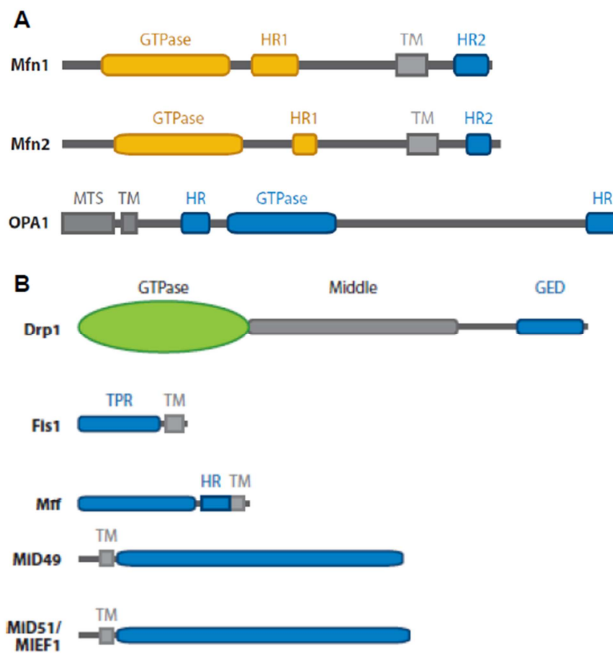


**Figura 2.** Representació de localitzacions de proteïnes de fusió i fissió, amb els seus possibles mecanismes d'acció. Adaptat de Lee et al. 2018

### 1.3.1. Fusió

La fusió de membranes és un procés clau en moltes activitats biològiques, com la fusió de lisosomes, fusió de gàmetes en la fecundació, etc. I en una majoria de casos el mecanisme pel que es fusionen és molt semblant. Les membranes que es volen unir s'acosten l'una a l'altre fins al punt que les bicapes lipídiques es desestabilitzen per inducció local de la curvatura<sup>17</sup> i formen una de sola. En tots els casos aquesta unió precedent a la fusió és causada per un seguit de proteïnes de membrana. En els mitocondris a més tenim dues membranes, i la necessitat d'unir quatre membranes entre elles augmenta la complexitat d'aquests processos.

Les primeres proteïnes descobertes amb funcionalitats referents a alguns d'aquests processos van ser les mitofusines<sup>23</sup>. Aquestes proteïnes són classificades dins la superfamília de les GTPases, ja que consumeixen GTP. Un esquema de la seva estructura es pot veure en la Fig. 3. Contenen dues regions transmembrana en la OMM, amb un *loop* a l'espai intermembranós i hepta-repeticions, tot això la major part de la seva estructura està dirigida cap al citosol, com es pot observar a la Fig. 4.

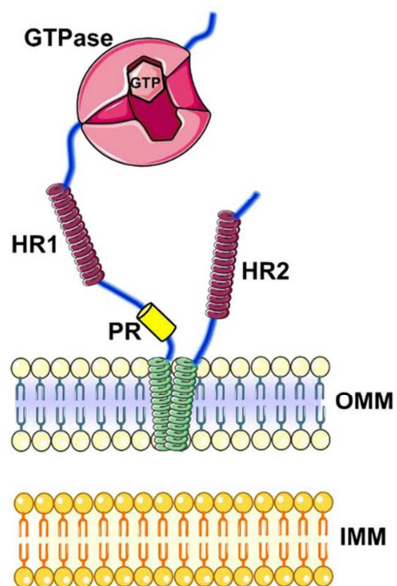


**Figura 3.** Estructura de les proteïnes involucrades en la fusió (A) i en la fissió (B). GTPase, domini GTPasa; HR, heptarepeticions; MTS, regió de redireccionament al mitocondri; GED, domini efector de GTPasa; TPR, domini tetratricopèptid; TM, domini transmembrana

És essencial per a un correcte desenvolupament embrionari, ja que ratolins deplecionats (knockouts, KO) de Mfn2 moren al dia 11 de gestació degut a errors en la placenta<sup>25</sup>. Els KOs condicionals de Mfn2 causen degeneració en un tipus específic de neurones, les cèl·lules de Purkinje, així com una localització anormal dels mitocondris en les cèl·lules dendrítiques<sup>26</sup>. A més a més, mutacions en aquest gen són la causa de la malaltia de Charcot-Marie-Tooth, més específicament del subtipus CMT2A<sup>27</sup>.

Els mamífers disposem de dues mitofusines, la mitofusina 1 (Mfn1) i la 2 (Mfn2). Una ablació de qualsevol d'aquestes o una pèrdua de la seva capacitat de GTPasa causa una fissió incontrolada de la xarxa mitocondrial cel·lular i per tant unes alteracions importants a nivell energètic i metabòlic en aquesta cèl·lula<sup>24</sup>.

MFN2 es una proteïna codificada pel gen *Mfn2*, localitzat al cromosoma 1. Formant part de la família de les GTPases com les altres mitofusines. L'acció de MFN2 és essencial per a un correcte desenvolupament embrionari, ja que ratolins deplecionats (knockouts, KO) de Mfn2 moren al



**Figura 4.** Estructura teòrica de *Mfn2* dins el mitocondri. Adaptat de Filadi et al. 2018

La mitofusina 1 (MFN1) és una proteïna amb una estructura molt similar a la de la MFN2, com es pot observar a la Fig. 3. En humans és codificada pel gen *Mfn1*, localitzat al cromosoma 3. Ambdues mitofusines són homologues de la proteïna de *Drosophila* anomenada “fuzzy onion”. També forma part de la família de les GTPases, i dins el mitocondri està localitzada en la OMM.

Una altra proteïna important implicada en la fusió és la Optic Atrophy Protein 1 (OPA1), també pertanyent a la superfamília de les GTPases. Aquesta proteïna es va descobrir primerament en llevats<sup>28</sup>, i més endavant es va confirmar la seva presència i funció en mamífers. La seva absència provoca una falta de fusió que genera una fragmentació mitocondrial més enllà de la variabilitat normal de la dinàmica

mitocondrial<sup>29</sup>. També té funcions relacionades amb el manteniment del DNA mitocondrial (mtDNA) i amb l'apoptosi.<sup>30</sup> El seu nom és degut a que una mutació en aquesta proteïna causa una malaltia anomenada Atrofia Ocular Dominant (en anglès, ADOA)<sup>31</sup>.

Com cada mitocondri té dues membranes, el procés de fusió consta de dues etapes: les mitofusines 1 i 2 catalitzen a l'inici d'aquesta fusió la unió de les OMMs formant homo i heterodímers amb les mitofusines membranals de l'altre mitocondri. Això ho fan a través de les heptà-repeticions, formant una “coiled coil” intermolecular i antiparal·lela, sent aquest procés impulsat per la hidròlisi de GTP. Això ajunta els dos mitocondris per tal que altres proteïnes acabin el treball. La OPA1 és una d'aquestes, que interacciona amb les membranes lipídiques directament per fusionar-les gràcies també a la hidròlisi de GTP<sup>32</sup>. Una representació simplificada d'aquest procés es pot veure en la Fig. 2. Això ha sigut comprovat en cèl·lules Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) de ratolins en les que, al fer un KO de OPA1, els mitocondris eren capaços d'unir les OMMs però a dins d'aquesta tenien diverses matrius independents. La membrana externa s'havia pogut fusionar però les internes no<sup>33</sup>.

### 1.3.2. Fissió

La fissió, sent el procés antagònic de la fusió, és també essencial per al bon funcionament i adaptació de la xarxa mitocondrial. La principal proteïna reguladora d'aquest procés es la *Dynamín Related Protein* (DRP1). Les dinamines participen en processos d'escissió de membranes vesiculars, tenint DRP1 una funció dins la mitocondria molt similar<sup>32</sup>. Aquesta consta d'un domini GTPasa, un domini “mig” i un domini *GTPase effector domain* (GED), com es pot veure a la Fig. 3. S'ha observat que



si s'inhibeix la funció de DRP1 les mitocondries es fan massa allargades fins que acaben col·lapsant en elles mateixes <sup>34</sup>.

En condicions normals aquesta proteïna es localitza al citosol, i per tant és necessari que sigui transportada al mitocondri. Les proteïnes de membrana mitocondrial que recluten DRP1 són *Fission 1 Homolog Protein* (Fis1), *Mitochondrial fission factor* (MFF) *Mitochondrial dynamics Protein of 49kDa* (MID49) i *Mitochondrial Dynamics protein of 51 kDa/Mitochondrial elongation factor 1* (MID51/MIEF1) <sup>34</sup>. De totes aquestes proteïnes de la única que tenim una certesa clara és de MFF, ja que la seva absència disminueix clarament la fissió mitocondrial. De la resta hi ha estudis contradictoris <sup>32</sup>.

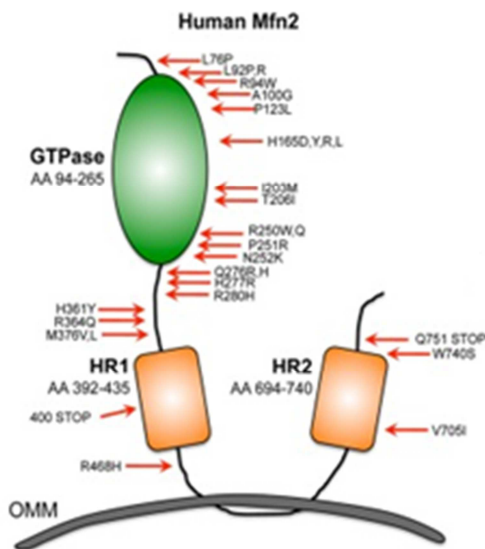
Interactuant amb aquests receptors, DRP1 forma estructures puntejades que envolten la estructura mitocondrial. Aquestes estructures formades per DRP1 fan d'anell de constricció al mitocondri, que se separa en dos unitats diferents. Es creu que el reticle endoplasmàtic (ER) pot ser un pas inicial en el reclutament de DRP1 en el mitocondri <sup>35</sup>, com es pot apreciar en la Fig. 2.

#### 1.4. Dinàmica i funció mitocondrial

Tots aquests processos de canvi en la morfologia mitocondrial són causa i conseqüència de l'estat metabòlic i energètic cel·lular. Per exemple, la deleció de Mfn2 indueix un menor consum d'oxigen acoblat a la síntesi d'ATP, un menor potencial de membrana i major producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) que acaben portant a una menor oxidació de glucosa, piruvat i àcids grassos <sup>25</sup>. La repressió tant de DRP1 o OPA1 s'ha relacionat també amb una disminució del consum d'oxigen per la síntesi d'ATP, del potencial i un augment del *leak* protònic, que consisteix en un desacoblament entre el potencial de membrana i la producció d'ATP <sup>32</sup>. Aquestes repressions a més es troben associades amb més apoptosi i inestabilitat del mtDNA, que a la vegada repercuteix en el manteniment d'aquest en la qualitat mitocondrial <sup>21</sup>. Degut a tot això, per determinar l'estat general de les mitocondries en una cèl·lula cal mesurar paràmetres tant morfològics com funcionals per tal de tenir el màxim d'informació possible sobre aquests orgànuls.

#### 1.5. Dinàmica mitocondrial i patologies

Estudis recents del nostre grup han trobat que pot haver-hi una relació entre la desregulació d'aquesta dinàmica i diverses patologies <sup>36</sup>. En relació amb malalties metabòliques, s'ha trobat una reducció de l'expressió de Mfn2 en múscul esquelètic de persones obesas, i la seva deficiència en el múscul esquelètic de ratolí també ha estat associat amb resistència a la insulina i intolerància a la glucosa com a resposta a una dieta alta en greixos. Alteracions en OPA1 també han estat relacionades amb alteracions metabòliques en cèl·lules  $\beta$  de ratolí amb OPA1 silenciada, que resulta en una secreció d'insulina alterada negativament. També s'ha trobat una expressió reduïda de MFN2 en artèries de rates amb hipertensió. Una deleció de MFN2 en



**Figura 5.** Mfn2 i les mutacions a aquesta associades amb CMT. Adaptat de Eschenbacher et al. 2012

cardiomiocits de ratolí induïx una cardiomiopatia progressiva. Mutacions en els gens Mfn2, les quals es poden observar en la Fig. 5, i Opa1 son responsables directament de les malalties de Charcot-Marie-Tooth subtipus 2A (CMT2A) i l'ADOA, respectivament. El mecanisme exacte pel qual mutacions en aquest gen de Mfn2 causen aquesta patologia encara no son coneguts, però se sospita que podria ser a causa de defectes en el transport axonal dels mitocondris <sup>37</sup>. Una altra malaltia relacionada amb mutacions en Mfn2 és la lipomatosis simètrica múltiple (MSL) <sup>38</sup>. Aquesta malaltia consisteix en un desordre en el metabolisme del teixit gras que provoca una acumulació d'aquest de manera simètrica a les cames i part superior del tòrax dels afectats.

Mutacions en homozigosi provoquen CMT i la mateixa mutació en heterozigosi provoca MSL.

Aquestes malalties son neuropaties. També s'ha demostrat que alteracions en aquesta dinàmica estan relacionats amb el desenvolupament neuronal, plasticitat i funció, i per tant es troben involucrades en diverses malalties neurodegeneratives com ara el Pàrkinson (*Parkinson Disease*, PD), l'Alzheimer (AD) o la malaltia de Huntington (HD). Gens mutats tant en HD com en PD com ara el *leucine-rich repeat kinase2*(LRRK2) i el *huntingtin*(HTT), s'ha trobat que promouen l'activitat de DRP1, una de les proteïnes de fissió. A més, s'ha observat en neurones de pacients amb AD fragmentació mitocondrial i un increment de la interacció entre DRP1 i la proteïna beta amiloide (A $\beta$ ) o la TAU. També es te evidències de que la sobreexpressió de DRP1 en el múscul desencadena l'atrofia d'aquest en ratolins, mentre que la inhibició de la fissió mitocondrial prevenia aquesta atrofia induïda per una sobreexpressió de la proteïna *Forkhead box O3* (FOXO3). La sobreexpressió d'OPA1 en ratolins ha tingut un efecte protector contra l'atrofia muscular produïda per una denervació. També s'ha detectat a MFN2 com una proteïna relacionada amb la sarcopènia en humans, ja que s'ha documentat una expressió reduïda d'aquesta en mostres de múscul de pacients sarcopènics d'edat avançada, en comparació amb controls d'igual edat però sense sarcopènia.

### 1.5.1. Charcot-Marie-Tooth

Charcot-Marie-Tooth (CMT) és un grup heterogeni de desordres genètics que presenten un fenotip de una neuropatia progressiva i crònica<sup>39</sup>. És una de les malalties neurològiques heretables més comuns a tot el món, amb una prevalença relativament alta de 1 entre 2.500 persones<sup>40</sup>. Aquest nom li va ser atorgat per honorar els tres metges que primer la van descriure en l'any 1886. No és una malaltia única, sota aquest nom s'agrupa una sèrie de trastorns que afecten als nervis perifèrics, nervis que no pertanyen ni al cervell ni a la columna vertebral i que es relacionen amb els músculs i òrgans sensibles de les extremitats<sup>41,42</sup>. Els principals símptomes de que algú pateix algun tipus de CMT és tenir poca força a l'hora de moure els peus i les extremitats inferiors, que poden donar una deformació al peu en forma d'arc engrandit i que pot derivar en caigudes i ensopegades freqüents. Deformitats del peu són també típiques d'un malalt de CMT, derivades de la debilitat dels músculs petits del peu. En un estadi més avançat, aquesta debilitat també es pot desenvolupar en les mans, resultant en dificultats per a dur a terme tasques motores fines, coordinant dits, mans, canells, peus i fins i tot la llengua.

Els diferents tipus de CMT són causats per diferents mutacions en gens que produeixen proteïnes involucrades en algun procés tant dins la estructura com la funció de la beina de mielina o del axó del nervi perifèric. S'han descobert mutacions que causen algun tipus de CMT en més de 40 gens, tot i que la majoria poc freqüents<sup>43</sup>. Tot i la variabilitat en les proteïnes afectades per aquestes mutacions, totes al final afecten la normalitat dels nervis axonals perifèrics. A causa d'això, els nervis van degenerant i comencen a perdre la capacitat de comunicar-se amb normalitat en distàncies llargues. És per aquest motiu que els símptomes es presenten en els nervis més llargs del nostre cos, com són els que arriben als peus, les mans i els seus sistemes. En alguns casos aquesta degeneració és extrema i pot reduir la capacitat per sentir el fred, la calor o el dolor.

Aquestes mutacions són normalment heretades, amb casos molt rars de una mutació apareguda *de novo*. Hi ha tipus de CMT que es poden heretar de manera autosomal dominant, on només una còpia defectuosa del gen ja fa que presentem símptomes, on altres tenen una forma autosomal recessiva, on només les dues còpies alterades poden fer que s'expressi aquest fenotip malalt. Un altre tipus de CMT s'hereta lligat al gen X, donant una major incidència d'aquest tipus dins els homes, al tenir com cromosomes sexuals XY.

Actualment no hi ha una cura que elimini aquesta malaltia, ja que com hem vist abans, és causada per mutacions a nivell genòmic. Tot i així, gràcies a la recerca s'han anat trobant quines activitats i rutines ajuden a suportar els símptomes desagradables de la CMT. Aquests tractaments són, entre altres, la teràpia física i ocupacional, l'ús de croses o altres equipaments ortopèdics o fins i tot cirurgia ortopèdica correctora pot

ajudar a aquests pacients a viure una mica millor. En els casos en que se sofreix un dolor sever, poden ser administrades drogues contra el dolor<sup>44</sup>.

### **1.6. La dinàmica mitocondrial com a diana farmacològica**

Vista la relació entre patologies diverses i alteracions en la dinàmica mitocondrial, és més rellevant que mai la cerca efectuada per multitud d'institucions, tant públiques com privades, de molècules capaces de millorar aquesta dinàmica. Aquestes molècules tindran diversos mecanismes d'acció, per l'objectiu últim i diana seria un augment de la fusió que millorés la morfologia i funció del conjunt de mitocondris cel·lulars. D'aquesta manera, l'estat general de l'organisme afectat per patologies relacionades amb problemes a la dinàmica milloraria al mateix temps que millora aquesta primera.

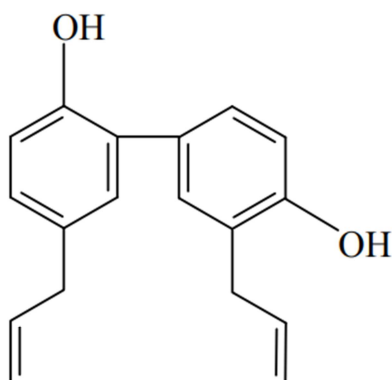
#### **1.6.1. Estudis previs**

Estudis previs realitzats pel nostre grup ja han identificat diverses molècules com a activadores de l'expressió de proteïnes de fusió, mitjançant tècniques *high-throughput*. Una d'aquestes, identificada per Miret-Casals et al., és la leflunomida. Aquesta molècula ha estat validada com a promotora de la expressió tant de MFN2 com de MFN1. Aquesta expressió millorava a la vegada l'elongació mitocondrial i el potencial de membrana, però no provocava canvis en la respiració mitocondrial<sup>45</sup>. Tot i aquests resultats esperançadors, el fet de que el mecanisme d'acció de la molècula sigui bloquejar la biosíntesi de pirimidines la fa inadequada per a l'administració a malalts crònics, com els afectats per ADOA o CMT. És una droga antiproliferativa i immunosupressora, cosa que la fa doblement perillosa per a la seva administració de manera crònica.

Uns altres composts avaluat pel nostre grup van ser una llibreria de nou molècules cedides per Novartis, que es van avaluar de manera molt similar a com s'ha fet en aquest estudi. De les nou inicials, tan sols tres elongaven els mitocondris a concentració 10 µM. Dos d'aquestes, tot i l'efecte elongador, empitjoraven l'estat dels mitocondris reduint el potencial de membrana i augmentant la quantitat de ROS produïda. Un estudi posterior va determinar que el seu efecte era independent de l'expressió de proteïnes de fusió, i que l'acció beneficiosa d'aquest compost també es donava en condicions amb altes concentracions de lípids, semblants a les que presenten les persones obesas que pateixen fragmentació de la xarxa mitocondrial. Tot i això, encara cal dilucidar la via d'acció d'aquest compost, i clarificar si la seva acció beneficiosa es fa a través d'un augment de la fusió o una inhibició de la fissió (Treball no publicat, Víctor Campos et al. & Davide Cinat et al.).

### 1.6.2. Honokiol

El Honokiol (Hnk) és un polifenol trobat a la natura distribuït entre diferents espècies del gènere *Magnolia*. Aquest compost ha sigut utilitzat com una medicina tradicional des de fa ja segles. Les plantes *Magnolia* són distribuïdes per tot el món, amb una presència destacada a l'Àsia, especialment a l'est i sud-est d'aquest continent. Últimament aquest compost ha estat investigat en profunditat i s'han trobat multitud de característiques terapèutiques, com antioxidant, antiinflamatòries, antimicrobianes, anticanceroses, antidepressiu i amb activitat neuroprotectiva <sup>46</sup>. S'ha descrit que el Hnk pot travessar la barrera hematoencefàlica, per tant suggerint que pot ser un compost terapèutic amb gran efectivitat contra una varietat de desordres neuronals.



**Honokiol**

**Figura 6.** Fórmula estructural del Honokiol

Això ens suggereix que tant la glucuronidació com la sulfatació són els processos més importants a l'hora de metabolitzar aquest fenilpropanoid. Estudis posteriors han determinat que l'oxidació és la fase principal de la metabolització del Hnk <sup>50</sup>. Les fases posteriors han sigut identificades com la gluconidació, sulfatació, acetilació i conjugació d'aminoàcids.

Aquesta molècula ja es troba en el mercat com a suplement alimentari, així que si es trobés que millora l'estat mitocondrial, la població afectada per alguna anormalitat en aquests es podria veure sobtadament amb un tractament per tal de millorar la seva qualitat de vida. Altres companys, fins i tot en el mateix grup del Dr. Zorzano, han estat investigant amb molècules la propietat de les quals és de empreses farmacèutiques. Aquestes molècules, tot i que s'ha vist que algunes funcionen, com s'ha explicat en els estudis previs, tenen un llarg camí per endavant fins arribar a les mans del públic general. Això és degut a la severa regulació que hi ha avui en dia sobre la venda i comercialització de nous medicaments i molècules. A més, cal pensar que la voluntat de les grans empreses farmacèutiques mai és fixa, i potser una molècula amb resultats esperançadors d'activació de la fusió es queda perduda entre la gran quantitat de projectes diferents que controlen aquestes corporacions.

És un fenilpropanoid, aïllable e identificable en varis espècies del gènere *Magnolia*, com *Magnolia officinalis*, *Magnolia obovata*, *Magnolia dealbata* i *Magnolia grandiflora*. La seva estructura química es pot apreciar en la Fig. 6. La quantitat de Hnk en pols de *Magnolia officinalis* es va establir en uns 18 mg/g <sup>47,48</sup> mentre que en la *Magnolia obovata* la part que més en contenia era la seva escorça, amb uns 0,246 mg/g. Un primer estudi <sup>49</sup> en ratolins descriu els metabòlits del Hnk com Hnk hidroxilat conjugat amb àcid glucurònic i sulfúric, i Hnk monogluconidat en fetges aïllats de rates inoculades amb 10 µM de Hnk.

Això ens suggereix que tant la glucuronidació com la sulfatació són els processos més importants a

## 2. Objectius

Un cop vista la importància de la dinàmica mitocondrial, com alteracions d'aquesta han estat relacionades amb diverses patologies i la seva importància com a diana farmacològica, ens vam preguntar per molècules capaces de millorar la fusió mitocondrial. Una d'aquestes que ens va cridar l'atenció va ser el Honokiol, que teníem sospites de que podria millorar alguns símptomes de mutacions genètiques a proteïnes relacionades amb la dinàmica mitocondrial. Com ja he explicat, el seu consum humà ha estat aprovat en forma de suplement alimentari, així que en cas d'uns resultats òptims l'accés de la població general a aquest compost podria ser molt ràpid.

Per avaluar aquest possible efecte, vam investigar:

1. L'efecte del Hnk sobre la morfologia mitocondrial de cèl·lules MEFs WT i KO per Mfn1 o Mfn2.
2. L'efecte del Hnk sobre la funció mitocondrial de cèl·lules MEFs WT i KO per Mfn1 o Mfn2.
3. Amb l'objectiu d'augmentar la translacionalitat del estudi, l'efecte del Hnk sobre la morfologia i funció mitocondrial de fibroblasts humans amb mutacions causants de CMT.

### 3. Materials i Mètodes

En aquest punt es mostra una versió resumida dels materials i mètodes utilitzats al llarg del projecte. Els protocols complets, pas per pas, així com els llistats de tots els materials utilitzats es poden trobar en l'Annex A.

#### 3.1. Línies cel·lulars

Al llarg de tot el projecte es va treballar amb cinc línies cel·lulars en total, tres Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) i dues de fibroblasts extrets a pacients amb mutacions a Mfn2. Les cèl·lules MEF són un tipus de fibroblast derivat d'embrions de ratolins. D'aquestes cèl·lules he utilitzat una línia WT, una altra KO per a la proteïna Mfn1 i la tercera KO per Mfn2. La primera per a simular l'estat d'una cèl·lula "sana" i les dues restants per a semblar un estat de cèl·lula "afectada" per una patologia com les esmentades a la introducció, constituint un model de fragmentació mitocondrial. Les dues de pacients tenen mutacions en Mfn2, en la línia F5354 una duplicació en heterozigosi (c.225dupT) d'una timina que dona lloc a la substitució de glutamina per alanina en la posició 754 de la proteïna, que crearà un codó STOP als 9 aminoàcids després d'aquest canvi (p.Gln754AlafsTer9). La línia F5339 té una substitució en homozigosi de citosina per timina (c.2119C>T + c.2119C>T) que provoca un canvi de arginina a triptòfan en la posició 707 de la proteïna (p.Arg707Trp + Arg707Trp). Aquestes dues mutacions a les cèl·lules de fibroblast humanes es troben descrites com a patogèniques al Human Gene Mutation Database (HGMD).

Les cinc línies cel·lulars es van cultivar en medi Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 25 mM Glucosa (cat n° 41966-029 Gibco), suplementat amb 10% Fetal Bovine Serum (FBS), Hapes 25 mM i Penicil·lina/estreptomycina 1%. Les cèl·lules es van créixer en incubadors a 37°C i una saturació del 5% de CO<sub>2</sub>. Per a la congelació de les línies a -80°C, es va fer servir el mateix medi suplementat amb crioprotector Dimetilsulfòxid (DMSO) al 10%. Al llarg de tot el projecte les cèl·lules van ser incubades amb Honokiol (Hnk) o el mateix volum de DMSO. La duració del tractament va ser sempre de 24 h i la concentració de 10 µM.

#### 3.2. Microscòpia confocal

Es van prendre imatges dels cultius cel·lulars mitjançant el microscopi làser confocal Zeiss LSM 780 amb l'objectiu d'observar la morfologia mitocondrial de les línies cel·lulars utilitzades, així com l'efecte sobre aquestes del Hnk. Es van sembrar 40.000 cèl·lules/pouet en plaques de 6 pouets (34,8 mm Ø, 9,5 cm<sup>2</sup>/pouet), posant en cadascun un cobre-objectes de 22 mm Ø esterilitzats prèviament sota llum UV durant 20 minuts i afegint 2 mL/pouet de medi DMEM 25 mM Glc suplementat amb 10% FBS, Hapes 25 mM i Penicil·lina/estreptomycina 1%. Les cèl·lules es van créixer durant 24 h a 37°C i una saturació del 5% de CO<sub>2</sub> i després es va canviar el medi pel mateix medi

DMEM però suplementat amb Hnk, a concentració 10  $\mu$ M, o bé DMSO com a control, sempre fent un rentat amb PBS prèviament. Posteriorment es retornaven a l'incubador 24h més per fer la incubació. En aquestes condicions, les cèl·lules assolien un 60-70% de confluència en 2 dies, ideal per a la seva observació. Trenta minuts abans de l'observació, les cèl·lules s'incubaven a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> amb 1 mL de medi/pouet que contingués la sonda MitoTracker Deep Red (Invitrogen) 50 nM (sonda de marcatge mitocondrial específic, veure Taula 1) i *DAPI Nucleic Acid Stain* (Invitrogen) diluït 1/10.000, tot a les fosques. Finalitzada la incubació, es realitzava un rentat amb PBS i s'afegien 2 mL medi/pouet. A continuació es procedia a l'observació i fotografia de les cèl·lules adherides a cada cobre-objectes, muntats sobre un suport, al microscopi confocal Zeiss LSM 780 del servei de microscòpia de l'IRB al PCB, sota l'objectiu d'oli 63x. L'aparell es va programar per a prendre imatges a un sol pla i irradiar cada secció amb dos làsers d'excitació diferents: un de 358 nm (UV), màxim d'excitació del DAPI que emet a 461 nm (blau), i un de 644 nm (vermell), màxim d'excitació del MitoTracker que emet a 665 nm. L'anàlisi i posterior processament de les imatges es va realitzar amb *ImageJ image analysis software*.

### 3.3. Citometria de fluxe

Aquesta tècnica es va utilitzar per detectar la fluorescència emesa per determinades sondes, cadascuna relacionada amb un paràmetre mitocondrial diferent. La descripció de les sondes, la concentració de treball i el paràmetre que ens permetia mesurar es troben recollits en la Taula 1.

Sonda	Proveïdor i Referència	Concentració de Treball	Màx. Absorció (nm)	Màx. Emissió (nm)	Paràmetre a mesurar
TMRM	ThermoFisher Scientific #134361, T668	250 nM	488	574	Potencial de membrana mitocondrial
MitoTracker Deep Red	Invitrogen #M22426	50 nM	644	665	Massa mitocondrial
CellROX Deep Red	Invitrogen #C10422	5 $\mu$ M	644	665	Producció de ROS mitocondrial

**Taula 1. Sondes utilitzades en la tècnica de citometria de fluxe.** TMRM i MitoTracker Deep Red són de localització mitocondrial específica perquè entren als orgànuls impulsades pel potencial de les seves membranes. Encara que el CCCP no és una sonda, s'ha inclòs perquè va ser un reactiu molt utilitzat al llarg de l'experimentació amb citometria de fluxe. A l'annex A es dona una explicació més extensa de les funcions i característiques de cadascuna de les molècules indicades.



Per a obtenir aquesta fluorescència, es van sembrar 25.000 cèl·lules/pouet de totes les línies cel·lulars en plaques de 24 pouets (15,6 mm Ø, 2 cm<sup>2</sup>/pouet), afegint en cadascun 0,5 mL del medi DMEM 10% FBS descrit en apartats anteriors. Les cèl·lules es van créixer durant 24 h a 37°C i una saturació del 5% de CO<sub>2</sub> i després es va canviar el medi pel mateix medi DMEM però suplementat amb Hnk a concentració 10 µM, o bé el solvent DMSO com a control. Passades 24 h més en l'incubador, les cèl·lules assolien una confluència del 100%. En aquest moment es va retirar aquest medi, es va afegir el medi suplementat amb la sonda d'interès, en funció del paràmetre a mesurar i a la concentració de treball. A continuació les cèl·lules es van incubar 30 minuts a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> i a les fosques. Transcorregut aquest temps, es va retirar el medi de tots els pouets, es va realitzar un rentat amb PBS, i es van tripsinitzar les cèl·lules de la placa amb 50 µL de tripsina temperada prèviament en cada pouet, incubant-les 3-4 minuts a 37°C. Finalment es va afegir 450 µL de medi en cada pou per a aturar l'acció de la tripsina. Protegides de la llum, es van portar les cèl·lules al servei de citometria del parc científic (CCiTUB). Allà es van introduir en tubs especials per al citòmetre, i es va procedir a llegir la fluorescència mitjançant protocols pre-programats en el citòmetre de fluxe *Gallios<sup>TM</sup>* (Beckman Coulter Life Sciences).

Com eren relatius, els resultats fluorimètrics obtinguts en tots els casos es van normalitzar pel paràmetre de massa mitocondrial per a tenir un valor relatiu a orgànul i no a cèl·lula completa, i el de la quantitat de superòxid, corregit per potencial de membrana (ja corregit a la vegada per la massa), ja que la mobilitat de la sonda CellROX es pot veure influïda per aquest potencial.

### **3.4. Tècniques de Western Blot: obtenció d'extractes, quantificació proteica i anàlisi per Western Blot**

#### *Obtenció d'extractes proteics cel·lulars totals*

Amb l'objectiu d'obtenir extractes proteics totals que permetessin un anàlisi posterior de l'expressió proteica mitjançant Western Blot, es van preparar cultius cel·lulars en plaques de 6 pouets, però sembrant inicialment 75.000 cèl·lules de totes les línies cel·lulars. El temps de creixement total també va ser de 48h, amb un canvi de medi per medi + Honokiol o medi + DMSO a les 24h d'iniciar el cultiu, obtenint després d'aquest temps cultius en una confluència del 100%.

En el moment de generar l'extracte, es va retirar el medi i es va fer un rentat amb PBS. A continuació, i sempre mantenint les mostres a 4°C per evitar la degradació proteica a causa de les proteases del citoplasma, de cada condició es van generar lisats amb un tampó de lisi que incloïa: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, inhibidors de fosfatases (2 mM Ortovanadat de sodi, 50 mM NaF i 20 mM pirofosfat de sodi) i inhibidors de proteases (una tableta cComplete<sup>TM</sup>, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail 04693159001 ROCHE per cada 10 mL de tampó). En cada

pouet es van afegir 150  $\mu\text{L}$  d'aquest tampó, en funció de la necessitat de concentració proteica per assajos posteriors, i es van recollir els extractes mitjançant un raspap amb espàtula i posterior transferència a tubs eppendorf. A continuació, es van homogeneïtzar les mostres fent-les passar 10 cops a través d'una xeringa d'agulla 20G. L'homogenat es va centrifugar 10 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$  i 700xg. El pellet constituït per cèl·lules no lisades i altres fragments grans es descartava, i es recuperava el sobre-nedant en un nou tub eppendorf. Els extractes generats es guardaven a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins el seu ús.

#### *Quantificació proteica dels extractes*

La concentració de proteïna en els extractes anteriors va ser mesurada fent servir el *Pierce BCA Protein Assay Kit* de *ThermoFisher Scientific*, ref. #23225. En plaques microtituladores de 96 pouets transparents, es va definir la recta patró amb una solució de BSA de 1mg/mL, afegint 0, 2,5, 5, 10 i 20  $\mu\text{g}$  d'aquesta proteïna en diferents pouets. Després, i amb l'ordre preferit, es van afegir per duplicat 2  $\mu\text{L}$  de cada extracte proteic en pouets diferents. A cada pou ocupat, es van addicionar 200  $\mu\text{L}$  de la solució de BCA 1x (resultat de mesclar un reactiu A 50x amb un diluent B), i es va incubar la placa a  $37^{\circ}\text{C}$  durant 15 minuts. El resultat es va obtenir a partir de l'absorbància de llum de longitud d'ona de 562 nm, detectada en l'espectrofotòmetre *Tecan Sunrise 96-well Microplate Reader* i processada en el *Magellan<sup>TM</sup>-Data analysis software*, interpolant els valors numèrics en la recta patró. Les quantificacions es van mantenir sempre dins el rang definit per la recta patró.

#### *Anàlisi per Western Blot*

Tenint en compte doncs la quantificació anterior, es van preparar en nous tubs el volum de cada extracte que contingués una mateixa quantitat proteica (en aquest cas, sempre s'han carregat 25  $\mu\text{g}$  de proteïna/mostra), i es van mesclar amb *Laemmli Sample Buffer* (LSB) 4x suplementat amb DTT com a agent reductor. A continuació es van bullir les mostres a  $95^{\circ}\text{C}$  durant 5 minuts i es van carregar amb l'organització preferida en un gel de poliacrilamida al 7,5 o al 10%, segons les proteïnes a observar, i sempre acompanyades de 10  $\mu\text{L}$  de patró de pes molecular als extrems del gel. Es va deixar progressar l'electroforesi durant 1'5 h a una intensitat fixa de 30 mA/gel, i tot seguit es van recuperar els gels per a realitzar una electrotransferència a membranes PVDF de les proteïnes separades, durant 1,5 h a 250 mA/cubeta (cada cubeta hi fiquem 2 gels). Les membranes PVDF aleshores es van bloquejar en 30 mL de solució de bloqueig (llet en pols 5% p/v en PBS-Tween al 0,1% v/v), incubant-les en agitació durant 1h a T ambient. Un cop bloquejats els llocs d'unió inespecífics de les proteïnes, es va procedir al rentatge amb 3 rentats de 10 min en agitació de les membranes amb PBS-Tween al 0,1% per eliminar l'excés de proteïnes de bloqueig. Finalment, es van incubar les membranes o fragments d'aquestes (si cal observar més d'una proteïna per exemple) amb l'anticòs primari corresponent O/N i a  $4^{\circ}\text{C}$ , en agitació o rotació en

orbital, o com alternativa, durant dues hores a temperatura ambient en agitació. Els anticossos utilitzats es poden consultar en la Taula 2.

Anticòs primari	Proveïdor i Referència	Dilució de Treball	Diluent	Mobilitat Aparent	Origen
Tubulina	Sigma #T5168	1/5000	PBS + 5% llet		Mouse
MFN1 (no human)	Abcam #ab126575	1/1000	PBS + 5% llet		Mouse
MFN1 (only human)	Cell Signaling #D6E2S 09/2017	1/1000	PBS + 5% llet		Rabbit
MFN2	Abcam #ab36289	1/1000	PBS + 5% llet		Mouse
OPA1	BD Biosciences #612606	1/1000	PBS + 5% llet		Mouse
DRP1	BD Biosciences #611112	1/1000	PBS + 5% llet		Mouse

**Taula 2. Anticossos utilitzats per tècniques de Western Blot.** Aquests anticossos primaris s'uneixen a les proteïnes que son reconegudes. A la vegada el anticòs secundari s'uneix a la part comuna de l'organisme productor, portant una molècula que produirà llum una vegada en contacte amb el substrat. Aquesta intensitat lumínica serà revelada i cuantificada.

A continuació, les solucions d'anticòs primari es van recuperar i es van poder conservar per posteriors usos a -20°C, i es van tornar a fer 3 rentats de 10 min a les membranes amb PBS-Tween al 0,1% en agitació i a T ambient. Tot seguit es va procedir a l'incubació de les membranes amb la solució d'anticòs secundari corresponent (anti-ratolí o anti-conill en funció de l'origen de l'anticòs primari), generada com una dilució 1/10.000 de la molècula en PBS-Tween al 0,1%. Per al revelat, aquests anticossos estaven conjugats amb l'enzim *Horseradish Peroxidase* (HRP), que després d'1 minut d'incubació amb el reactiu *Immobilon Classico Western HRP Substrate*, produeixen una quimioluminiscència que queda impresa sobre films fotogràfics *Fuji Super RX-N Blue Film 18x24cm* de Fujifilm o *Amersham Hyperfilm ECL 18x24cm* de GE Healthcare quan es posen sobre les membranes PVDF, a temps de contacte variables (quan menor sigui la quantitat de certa proteïna, major serà el temps necessari per a veure'n senyal). El revelat dels films es va realitzar amb el revelador automàtic *HYPERPROCESSOR* de GE

*Healthcare Life Sciences*, i la quantificació densitomètrica de les bandes obtingudes es va llegir amb *Quantity One 1-D Analysis Software* de *BioRad*.

En el cas de voler veure dues proteïnes de pes molecular molt similar o d'un mal primer revelat, es pot procedir amb l'*stripping*, on les membranes PVDF són rentades 3 cops durant 10 minuts en agitació amb aigua destil·lada a 100°C, i després es tornen a bloquejar, rentar i incubar amb l'anticòs primari i secundari corresponents. Finalment es procedeix al revelat per a detectar els nous resultats.

### **3.5. Assaig de consum d'oxigen d'un cultiu cel·lular (XF24 Extracellular Flux Assay, Seahorse)**

Per a tenir una mesura directa i més precisa del funcionament de la cadena de transport electrònic, calia mesurar el consum d'oxigen en la respiració mitocondrial. L'aparell que permet avaluar aquest paràmetre és el *XF24 Extracellular Flux Analyzer* de *Seahorse Bioscience*.

Per a la realització de l'experiment, es van sembrar 20.000 cèl·lules MEF/pouet tant de WT com KO en plaques de 24 pouets específiques per a aquesta mesura (6,35 mm Ø i 0,317 cm<sup>2</sup>/pouet), afegint en cadascun 0,3 mL del medi DMEM 10% FBS descrit en apartats anteriors. Les cèl·lules es creixien durant 24 h a 37°C i una saturació del 5% de CO<sub>2</sub> i després es canviava el medi de la mateixa manera que en l'apartat 3.1 (amb un rentat amb PBS i un volum de 0,3 mL enlloc de 0,5 mL, per suposat). A més, en aquest moment s'equilibrava el cartutx de la placa que contenia les sondes de mesura, posant-la sobre una placa igual a la que es sembraven les cèl·lules, però plena del tampó XF Calibrant (pH 7,4) proporcionat per la casa comercial, i es deixava O/N en un incubador a 37°C i sense CO<sub>2</sub>. Rere 24 h més en l'incubador, les cèl·lules assolien una confluència del 100%, instant en el que es realitzava un altre rentat amb PBS i es canviava el medi per 700 µL/pouet de medi DMEM pobre: amb Glucosa 5,5 mM, Glutamina 2 mM, Piruvat de Sodi 1 mM, Penicil·lina/Estreptomicina al 1% i pH 7,4, però sense tampó HEPES ni sèrum. El cultiu es deixava 1 h a 37°C i sense CO<sub>2</sub>. A continuació es recuperava el cartutx i es carregaven els seus canals amb 75 µL d'inhibidors de la cadena respiratòria dissolts en medi DMEM pobre, en el següent ordre (veure Fig. A10, Annex A): (A) Oligomicina 12,5 µM (inhibidor de l'ATP sintasa), (B) CCCP 10 µM, (C) CCCP 5 µM, (D) Rotenona 1 µM + Antimicina 1 µM (inhibidors dels complexos I i III respectivament). Aquestes concentracions ja estan adaptades a cèl·lules MEF i són a 10x per a que al injectar-se en el pouet quedessin en la concentració de treball. Finalment, el cartutx s'introduïa en el *XF24* durant uns 30 minuts aproximadament per a calibrar-lo, i posteriorment es recuperaven les cèl·lules de l'incubador per a la mesura del *Oxygen Consumption Rate* (OCR o oxigen consumit), procés que s'allarga 3 h.

### 3.6. Anàlisi estadístic

Per a la quantificació de l'elongació mitocondrial provocada pel Honokiol s'han comptabilitzat un mínim de 100 cèl·lules per cada condició, i classificant totes aquestes segons l'estat de les xarxes mitocondrials. L'estadística es va realitzar amb el software *Microsoft Excel*, realitzant tests de T-Student.

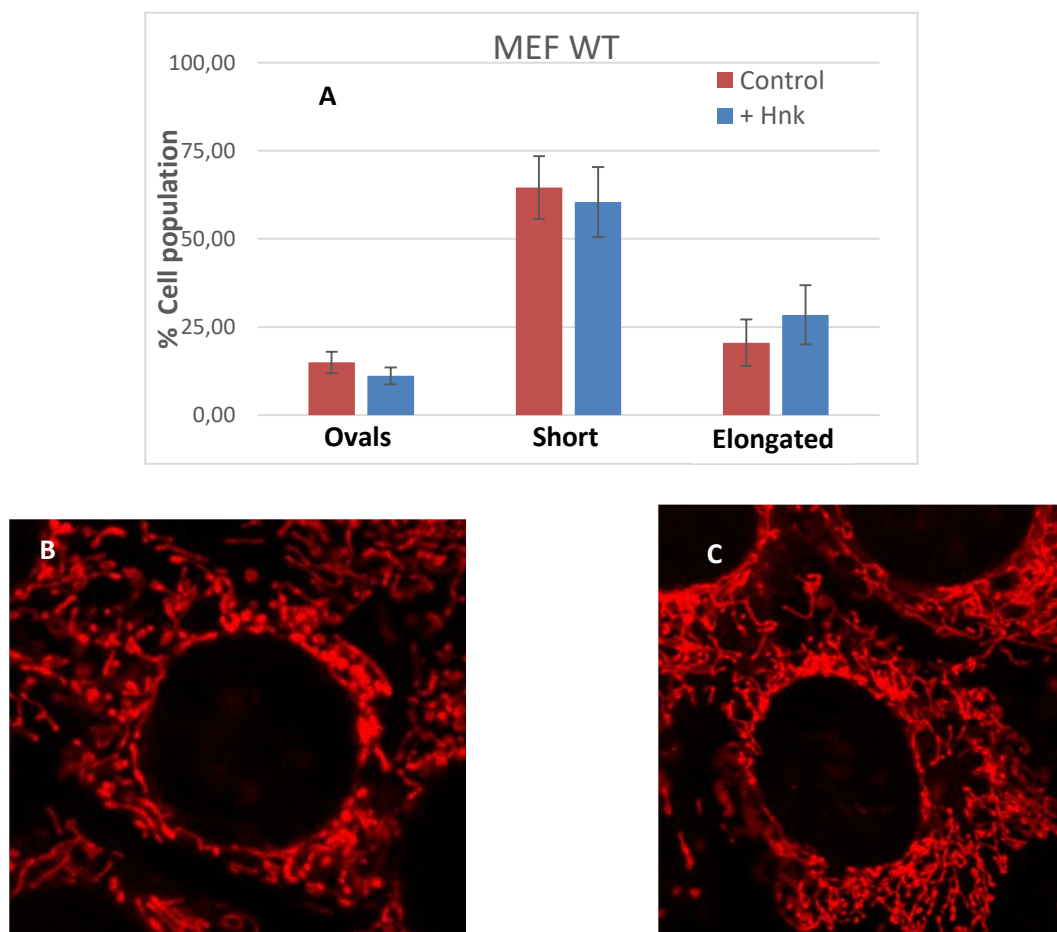
Els gràfics resultants dels assajos de citometria i consum d'oxigen en el *Seahorse XF24 Extracellular Flux Assay* es presenten com la mitjana  $\pm$  l'error estàndard (SE). L'anàlisi estadístic de les proves on disposàvem de tres experiments s'ha realitzat amb el software *Microsoft Excel*, mitjançant tests de T-Student.

Els tests sempre s'han executat amb un nivell de significació a 0,05 ( $\alpha=0,05$ ), i el p-valor s'ha representat amb asteriscs amb el següent codi: "\*" =  $p \leq 0,05$  ; "\*\*\*" =  $p \leq 0,01$  ; "\*\*\*\*" =  $p \leq 0,001$ .

## 4. Resultats

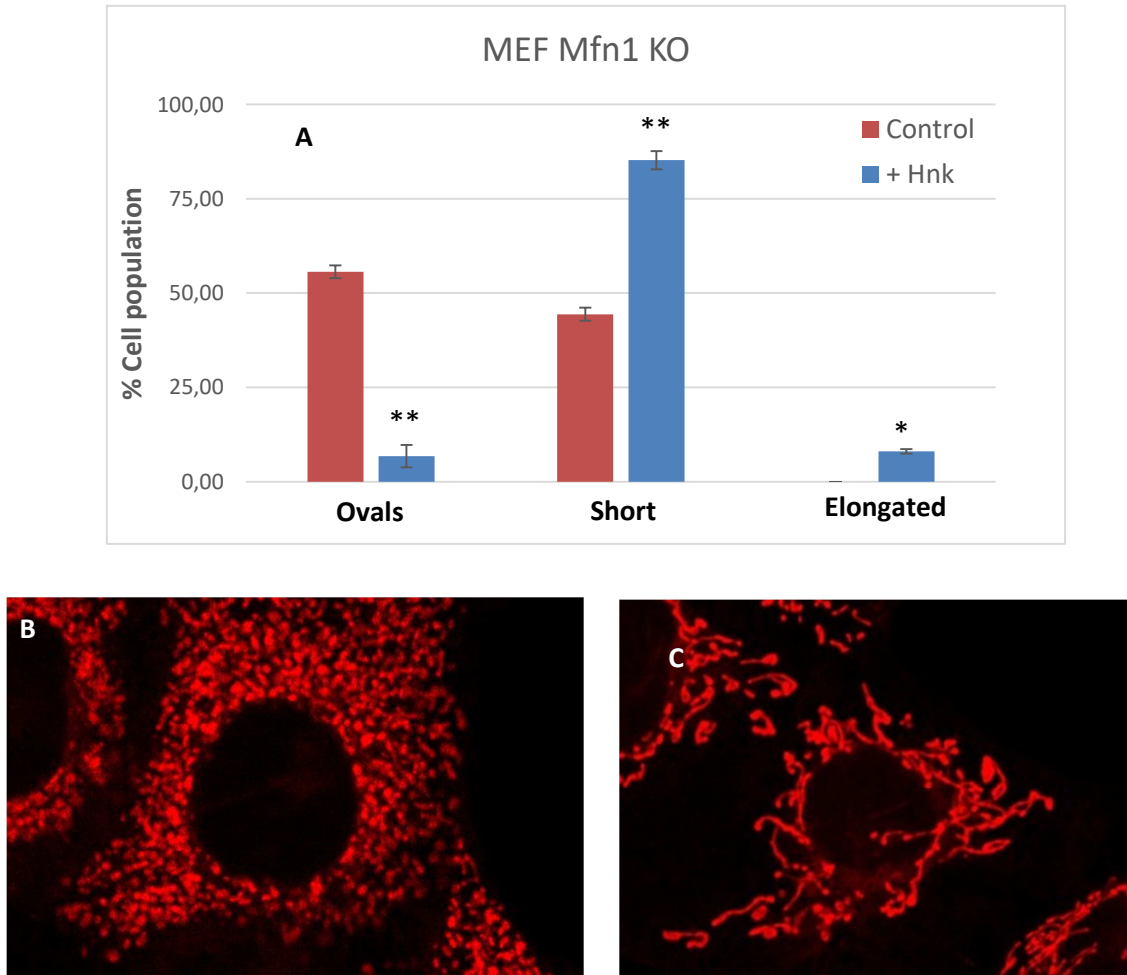
### 4.1. Anàlisi de l'efecte del Honokiol sobre la morfologia mitocondrial en cèl·lules MEF

Estudis previs del grup van trobar que el Hnk era capaç d'augmentar l'expressió de MFN2 en cèl·lules MEF WT. Per tal de comprovar si això anava acompanyat de canvis en la morfologia mitocondrial, es va incubar aquesta mateixa línia cel·lular 24h amb Hnk 10  $\mu$ M. A continuació es van marcar els mitocondris amb MitoTracker Deep Red i es van observar en el microscopi confocal.



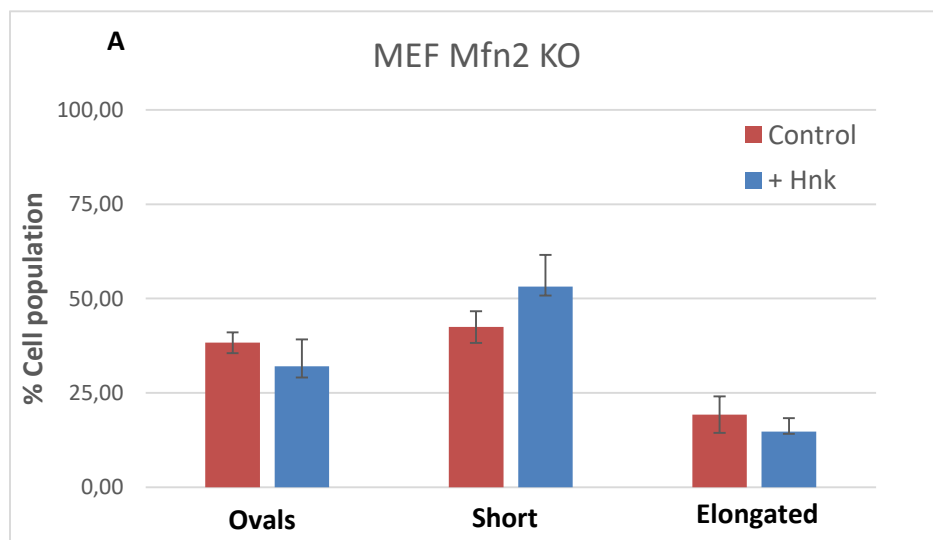
**Figura 7. Efecte del Hnk sobre la morfologia mitocondrial de cèl·lules MEF WT.** (A) Quantificació del % de la població cel·lular MEF WT amb mitocondris ovalats (sense elongació aparent), curts ( $<5\mu\text{m}$ ) o elongats ( $>5\mu\text{m}$ ), després d'una incubació de 24h amb Hnk 10  $\mu\text{M}$ . (B) Imatge de cèl·lules MEF WT Control, amb els mitocondris marcats per MitoTracker DeepRed. (C) Imatge de cèl·lules MEF WT + Hnk 10  $\mu\text{M}$  Presa d'imatges feta amb microscopi confocal Anàlisi d'imatges realitzat amb ImageJ. Es van comptabilitzar 100 cèl·lules per condició pertanyents a 10 camps òptics diferents. (n=3)

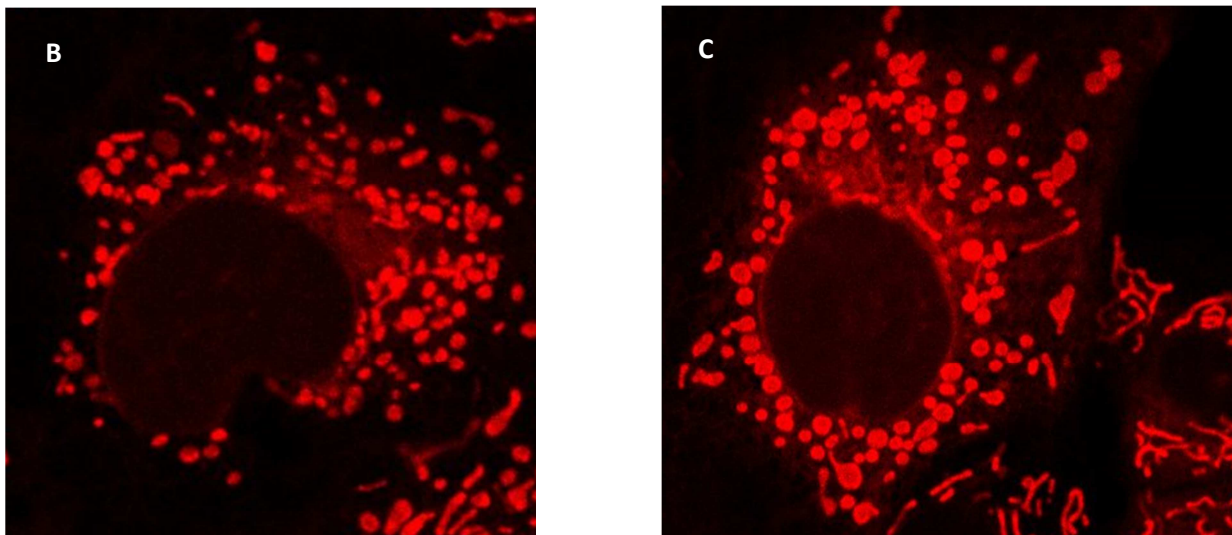
Veient la Fig. 7 podem observar que només hi ha una tendència, no significativa, a un augment del percentatge de cèl·lules amb mitocondris elongats. Per tal de comprovar l'efecte en cèl·lules amb una morfologia molt fragmentada i més semblant a la morfologia relacionada amb determinades patologies, vam avaluar aquest efecte també en cèl·lules MEF KO1 i MEF KO2.



**Figura 8. Efecte del Hnk sobre la morfologia mitocondrial de cèl·lules MEF KO1.** (A) Quantificació del % de la població cel·lular MEF Mfn1 KO amb mitocondris ovalats, curts o elongats després d'una incubació de 24h amb Hnk 10 µM. (B) Imatge de cèl·lules MEF KO1 Control, amb els mitocondris marcats per MitoTracker DeepRed. (C) Imatge de cèl·lules MEF KO1 + Hnk 10 µM. Presa d'imatges feta amb microscopi confocal. Anàlisi d'imatges realitzat amb ImageJ. Es van comptabilitzar 100 cèl·lules per condició pertanyents a 10 camps òptics diferents. (n=3). Anàlisi estadístic amb T-Student, \*\* p-valor ≤ 0.01; \* p-valor ≤ 0.05.

En la Fig. 8 podem observar com l'incubació de cèl·lules MEF KO Mfn1 amb Hnk va provocar una elongació mitocondrial, tal i com es pot observar per una disminució de cèl·lules amb mitocondris ovalats, amb un augment del percentatge de cèl·lules amb mitocondris curts i elongats.





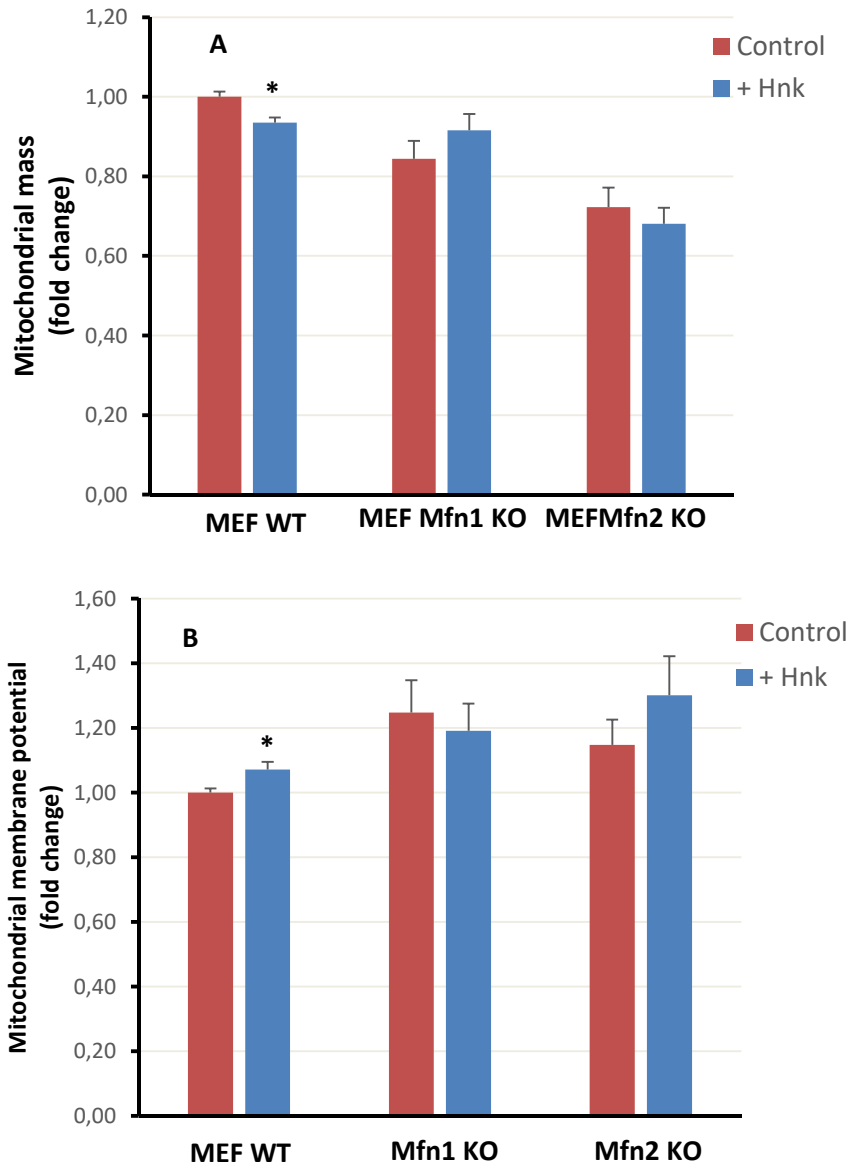
**Figura 9. Efecte del Hnk sobre la morfologia mitocondrial de cèl·lules MEF KO2.** (A) Quantificació del % de la població cel·lular MEF Mfn2 KO amb mitocondris ovalats, curts o elongats, després d'una incubació de 24h amb Hnk 10  $\mu$ M. (B) Imatge de cèl·lules MEF KO2 Control, amb els mitocondris marcats per MitoTracker DeepRed. (C) Imatge de cèl·lules MEF KO2 + Hnk 10  $\mu$ M. Presa d'imatges feta amb microscopi confocal. Anàlisi d'imatges realitzat amb ImageJ. Es van comptabilitzar 100 cèl·lules per condició pertanyents a 10 camps òptics diferents. (n=3). Anàlisi estadístic amb T-Student, \*\* p-valor  $\leq 0.01$ ; \* p-valor  $\leq 0.05$ .

En cèl·lules MEF KO Mfn2 (Fig. 9) no es va observar cap efecte de aquesta incubació, per tant aquests resultats ens fan pensar que el possible efecte elongador del Honokiol és realitzat a través de Mfn2, i que Mfn1 no és substituït d'aquesta funció.

#### 4.2. Anàlisi de la massa mitocondrial i el potencial de membrana en cèl·lules MEF

Un cop avaluat l'efecte del Hnk en la morfologia a les diferents línies de MEF, vam voler avaluar l'efecte d'aquest compost en la funció dels mitocondris. No seria un bon compost per a afavorir la fusió si tot i millorar la morfologia, l'estat energètic mitocondrial empitjorés. La primera mesura que permet avaluar aquest paràmetre és la mesura del potencial de membrana mitocondrial tot utilitzant tècniques de citometria de flux. Aquestes dades seran corregides en funció de la massa mitocondrial present en aquestes cèl·lules, per igualar el potencial en funció de la quantitat de mitocondris. Tal i com es pot observar en la Fig. 10 (A) i (B), el tractament amb Hnk va provocar una disminució de la massa mitocondrial en cèl·lules MEF WT, seguit d'un augment en el potencial de membrana. En el cas de les cèl·lules MEF KO Mfn1 i KO Mfn2, el Hnk no va tenir cap efecte significatiu en cap d'aquests paràmetres.

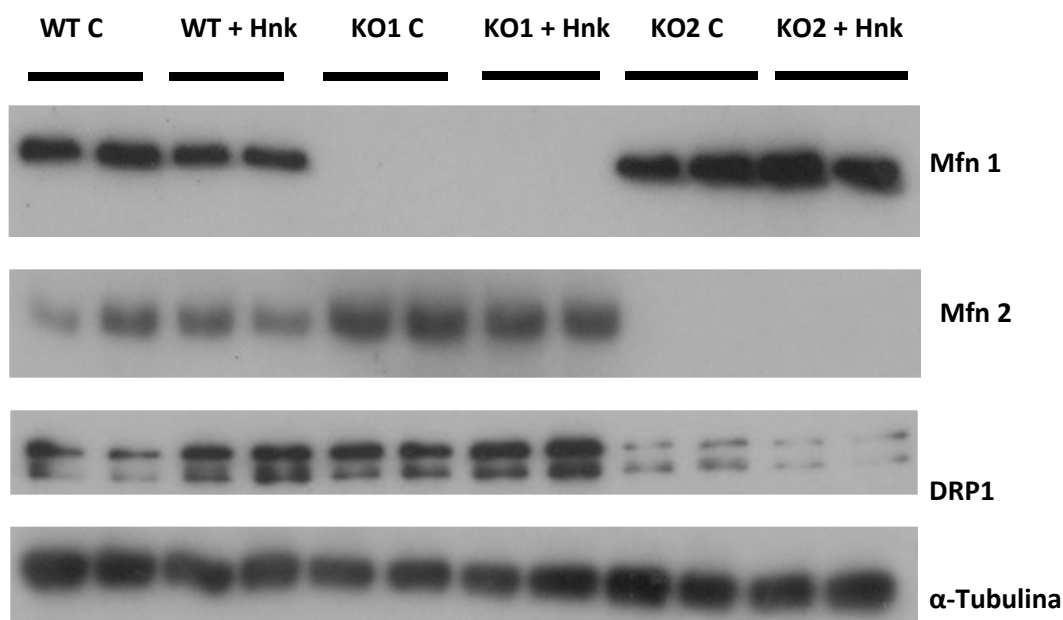




**Figura 10. Efecte del Hnk sobre la massa i el potencial de membrana.** (A) Mesura de la massa mitocondrial. (B) Mesura del potencial de membrana normalitzat amb la massa mitocondrial. El marcatge de la massa mitocondrial ha estat efectuat amb MitoTracker Deep Red i el del potencial de membrana amb TMRM. Ambdues figures comparen les condicions control amb el tractament de 24h amb Hnk 10 $\mu$ M. Mostren el fold change  $\pm$  SE de 5 experiments diferents amb 2 rèpliques de cada condició. \* p-valor  $\leq$  0.05

### 4.3. Expressió de proteïnes de fusió i fissió en cèl·lules MEF

Per tal d'avaluar l'efecte que té el Honokiol a nivell d'expressió de proteïnes, vam fer Western Blot dels extractes proteics aconseguits de cèl·lules MEF. En la Fig. 5 podem observar els resultats d'aquests. El protocol complert d'aquesta tècnica es pot veure a l'Annex A.



**Figura 11. Efecte del Honokiol sobre l'expressió de proteïnes implicades en dinàmica mitocondrial en cèl·lules MEF.** (A) Imatge representativa dels assajos de Western Blot realitzats a partir de 3 llistats totals de cèl·lules MEF. Càrrega de 25 µg de proteïna per carril.

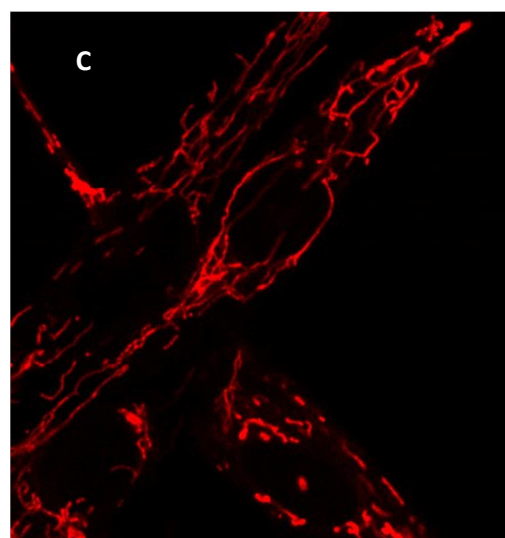
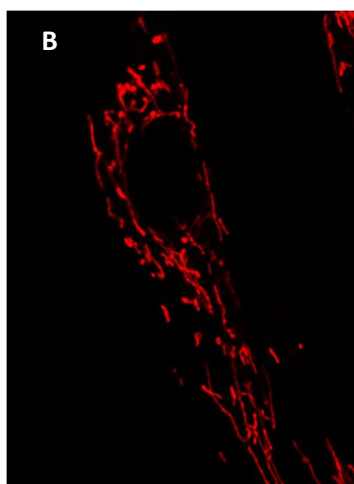
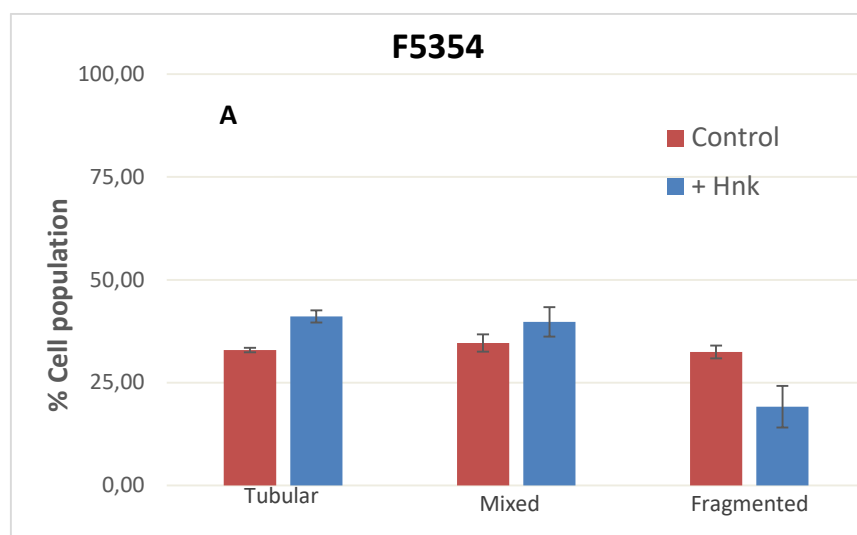
A la Fig. 11 podem observar clarament que les MEF KO per a Mfn1 ho són, al no trobar aquesta proteïna en el WB. De la mateixa manera, les MEF Mfn2 KO tampoc tenen la proteïna MFN2.

La incubació amb Hnk va provocar una tendència aquí observable d'un augment de DRP1 en les cèl·lules MEF WT i KO1, amb un descens en les KO2. Aquest descens és accentuat per la incubació amb Hnk. Tots els altres nivells d'expressió proteica observats no han sofert canvis.

Degut a problemes tècnics, només s'ha pogut fer un Western Blot per cada proteïna, per tant fer una quantificació i estadística d'aquesta ha sigut impossible.

Amb l'objectiu d'augmentar la translacionalitat del nostre estudi, vam creure interessant avaluar els efectes del Honokiol en uns fibroblasts amb mutacions en el gen de Mfn2, que fa que estiguin més a prop de les característiques que es poden trobar en cèl·lules de pacients amb malalties relacionades amb alteracions de la dinàmica. Aquí es presenten els resultats d'aquesta segona part del treball.

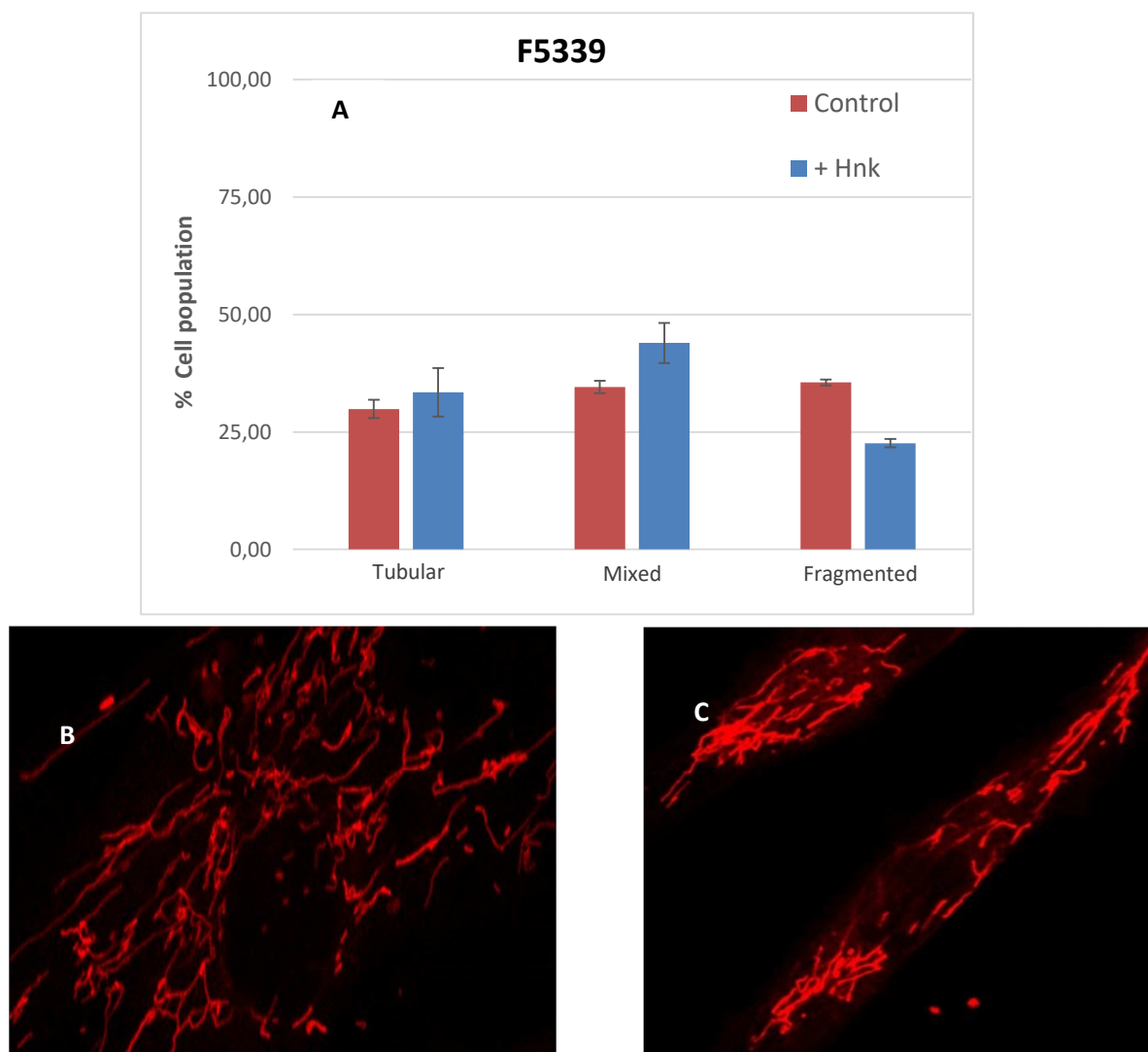
#### 4.4. Anàlisi de l'efecte del Honokiol sobre la morfologia mitocondrial en fibroblasts humans



**Figura 12. Efecte del Hnk sobre la morfologia mitocondrial de fibroblasts 5354.** (A) Quantificació del % de la població cel·lular de fibroblasts amb xarxa mitocondrial tubular, fragmentada o una combinació de les dues (mixed), després d'una incubació de 24h amb Hnk 10  $\mu$ M. (B) Imatge de fibroblasts 5354 Control, amb els mitocondris marcats per MitoTracker DeepRed. (C) Imatge de fibroblasts 5354 + Hnk 10  $\mu$ M. Anàlisi d'imatges realitzat amb ImageJ. Es van comptabilitzar 100 cèl·lules per condició pertanyents a 10 camps òptics diferents. (n=2).

En la Fig. 12 podem apreciar el tractament amb Honokiol en els fibroblasts 5354, portadors de una duplicació en heterozigosi que acaba creant un codó stop a la posició 763, ja en el domini citoplasmàtic de la proteïna. Aquest efecte es manifesta en una

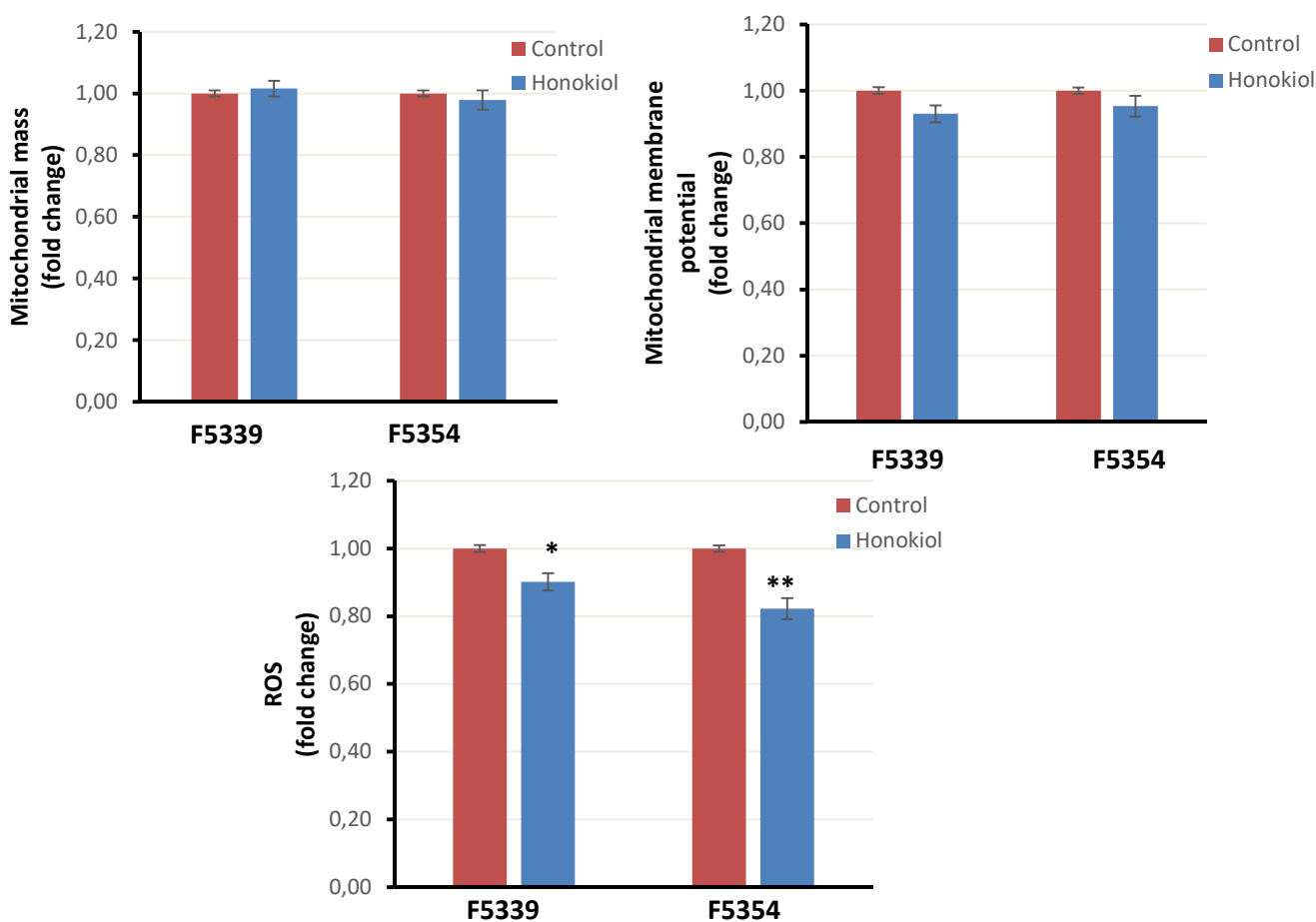
tendència a augmentar el percentatge de xarxa mitocondrial tubular dins aquestes cèl·lules. Una altra tendència observable és la de reduir amb el tractament de Hnk les xarxes fragmentades amb un augment no significatiu de les mixtes.



**Figura 13. Efecte del Hnk sobre la morfologia mitocondrial de fibroblasts 5339.** (A) Quantificació del % de la població cel·lular de fibroblasts 5339 amb xarxa mitocondrial tubular, fragmentada o una combinació de les dues (mixed), després d'una incubació de 24h amb Hnk 10  $\mu$ M. (B) Imatge de fibroblasts 5339 Control, amb els mitocondris marcats per MitoTracker DeepRed. (C) Imatge de fibroblasts 5339 + Hnk 10  $\mu$ M. Anàlisi d'imatges realitzat amb ImageJ. Es van comptabilitzar 100 cèl·lules per condició pertanyents a 10 camps òptics diferents. (n=2).

En la Fig. 13 podem observar els fibroblasts 5339, portadors d'una substitució en homozigosi d'una citosina per timina, provocant un canvi d'arginina a triptòfan en la posició 707 de la proteïna Mfn2. En aquesta morfologia, gràcies al tractament amb Honokiol, s'observa una tendència a augmentar el percentatge de xarxa mixta tot relacionat amb una disminució significativa de les fragmentades. Tot i amb les tendències observades, no s'ha pogut fer cap comparació estadística degut al nombre insuficient de probes efectuades, només dos experiments per condició.

#### 4.5. Anàlisi de la massa mitocondrial, potencial de membrana i producció de ROS en fibroblasts humans

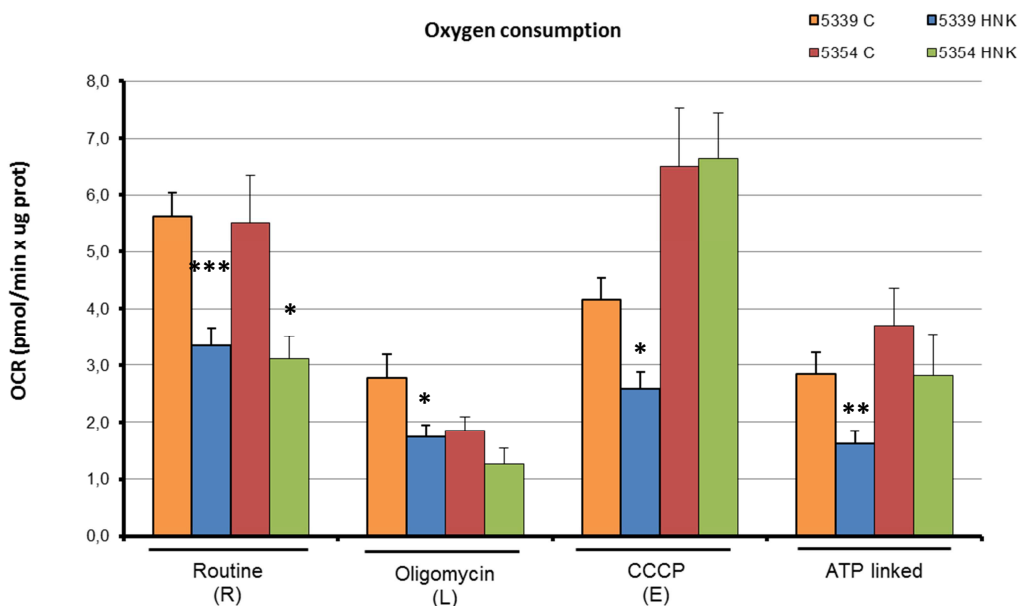


**Figura 14. Efecte del Hnk sobre la massa, potencial de membrana i producció de ROS en fibroblasts.** (A) Mesura de la massa mitocondrial. (B) Mesura del potencial de membrana normalitzat amb la massa mitocondrial. (C) Mesura de la producció de ROS. El marcatge de la massa mitocondrial ha estat efectuat amb MitoTracker Deep Red, potencial de membrana amb TMRM i producció de ROS amb CellRox. Les tres figures comparen les condicions control amb el tractament de 24h amb Hnk 10 $\mu$ M. Mostren el fold change  $\pm$ SE de 3 experiments diferents amb 2 rèpliques de cada condició. Anàlisi estadístic amb T-Student, \* p-valor  $\leq$  0.05; \*\* p-valor  $\leq$  0.01.

De la mateixa manera que per a les línies de MEFs, ens és útil per caracteritzar els efectes del Honokiol saber si augmenta la massa mitocondrial o el potencial de membrana. També permet determinar l'estat dels mitocondris la producció de ROS, concretament d'ió superòxid. En la Fig. 14 podem observar l'efecte que té el tractament amb Hnk 10  $\mu$ M. A la massa mitocondrial no s'observen canvis més enllà dels errors standard. Al potencial de membrana s'observa una tendència a reduir-se després del tractament, però no és significativa. El canvi rellevant és la disminució de forma significativa de la producció de ROS per part dels mitocondris després del tractament amb Hnk. Això ens suggereix que els mitocondris després de ser tractats produeixen menys radicals lliures, i per tant el seu funcionament intern ha millorat.

#### 4.6. Efecte del Honokiol sobre la respiració mitocondrial en fibroblasts humans

Una vegada avaluats els efectes del Hnk en la morfologia i estat dels mitocondris en els fibroblasts derivats d'humans, era l'hora de mesurar si el Hnk tenia algun efecte en el consum d'oxigen cel·lular. Aquesta mesura es va realitzar amb el *XF24 Extracellular Flux Analyzer*, de *Seahorse Bioscience*. Degut al gran cost i complexitat d'aquesta tècnica, es va realitzar només amb les cèl·lules més interessants de que disposàvem, que eren els fibroblasts d'humans.

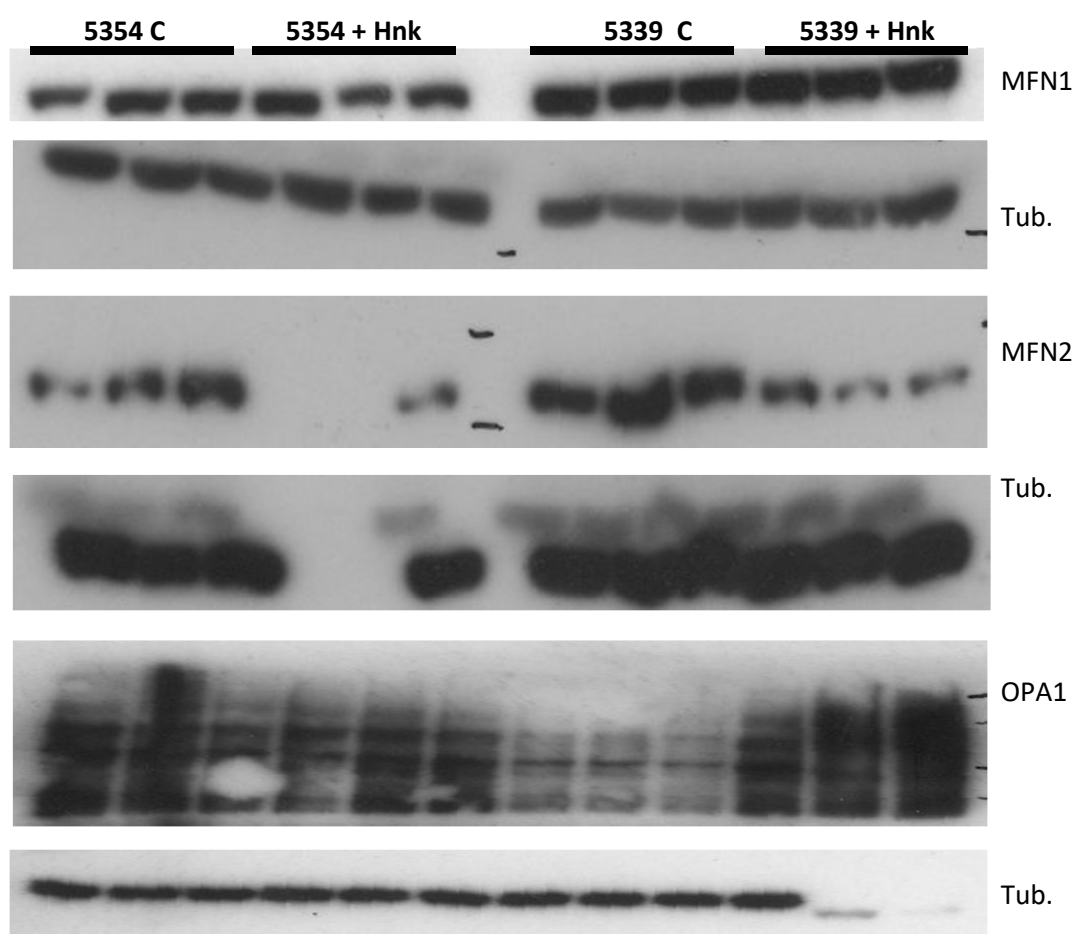


**Figura 15. Efecte del Hnk sobre la respiració mitocondrial.** Els gràfics mostren el consum d'oxigen mitocondrial de cultius de fibroblasts control o tractats 24h amb Hnk 10 $\mu$ M, amb presència o absència de certs inhibidors de la respiració. Les dades s'han corregit per la quantitat de proteïna en cada pouet de l'assaig. Els gràfics mostren la mitjana  $\pm$  SE de dos experiments amb 5 rèpliques per cada condició. Anàlisi estadístic amb T-Student, \* p-valor  $\leq$  0.05; \*\* p-valor  $\leq$  0.01; \*\*\* p-valor  $\leq$  0.005

Veient els resultats de la Fig. 15, es pot observar com el tractament amb Honokiol redueix en gran quantitat el consum d'oxigen (OCR). La respiració de rutina d'ambdós línies cel·lulars es veu significativament reduïda, amb un grau més la dels fibroblasts 5339. Tot i això, la mesura del consum d'oxigen de rutina no és del tot determinant: cal assegurar-se de quina fracció del consum d'oxigen està rebaixant aquest tractament. A l'inhibir amb la oligomicina el complex ATP sintasa de la cadena transportadora d'electrons, el consum d'oxigen es redueix encara més, indicant-nos quant d'aquest consum d'oxigen estava realment associat amb la síntesi d'ATP. Aquí la baixada del OCR només es significativa en el cas dels fibroblasts 5339, però la mateixa tendència és observable en les dues línies. L'última mesura, la de respiració màxima, s'aconsegueix afegint al cultiu CCCP, que despolaritza els mitocondris indicant el màxim consum d'oxigen, i per tant de síntesi d'ATP, al que podrien arribar aquestes cèl·lules en cas de necessitat, com ara en moments d'estrès o d'exercici físic intens. Aquí cal destacar que

el tractament amb Hnk torna a empitjorar els resultats dels fibroblasts 5339, però no afecta a els del tipus 5354. Això ens indica que el tractament ha millorat l'eficiència de la respiració d'aquestes cèl·lules. Resumint, aquests resultats ens indiquen que el tractament empitjora l'estat dels fibroblasts 5339 però que en els del tipus 5354 en millora l'eficiència. A totes aquestes dades se els hi ha restat el consum de cada cultiu en presència de rotenona i antimicina, que a l'inhibir els complexos I i III bloquejant per complet el consum d'oxigen en la cadena de transport d'electrons. Això ens permet mesurar només el consum de la cadena, havent eliminat el consum d'aquest element a d'altres localitzacions cel·lulars.

#### 4.7. Expressió de proteïnes de fusió i fissió en fibroblasts humans



**Figura 16.** Efecte del Honokiol sobre l'expressió de proteïnes implicades en dinàmica mitocondrial en cèl·lules MEF. (A) Imatge representativa dels assajos de Western Blot realitzats a partir de 3 llistats totals de cèl·lules MEF. Càrrega de 25 µg de proteïna per carril.

La incubació amb Hnk no va provocar gaires canvis en la expressió de proteïnes de fusió i fissió mitocondrials, excepte una tendència a incrementar l'expressió de OPA1 en els fibroblasts 5339. Degut als problemes tècnics que ens vam trobar a l'hora de fer l'expressió proteica de les cèl·lules, només hem pogut realitzar un WB per proteïna i ens ha sigut impossible realitzar una quantificació i estadística sobre aquesta.

## 5. Discussió

La dinàmica mitocondrial, com ja hem vist, és un procés vital per a mantenir un mitocondri en bon estat. Donat la importància d'aquest orgànu en la producció de l'ATP necessari per a l'activitat cel·lular, no es baladí dir que les condicions d'aquest també influeixen en l'estat general de la cèl·lula, i per extensió, de l'organisme al que pertany. Així doncs, és obvi que mutacions en les proteïnes responsables de la fusió i la fissió afectaran a la dinàmica, de retruc la funció mitocondrial es veuria afectada i finalment podria portar a l'aparició de patologies. Algunes d'elles ja han estat introduïdes abans en aquest treball, com la síndrome de Charcot-Marie-Tooth, l'Atròfia Òptica Autosòmica Dominant (ADOA), la Lipomatosi Simètrica Múltiple (MLS), entre d'altres. Una característica en comú de totes aquestes malalties és que, degut a presentar mutacions que alteren les proteïnes principals de la fusió mitocondrial, les cèl·lules dels individus afectats presenten unes xarxes mitocondrials molt fragmentades, degut a una falta de balanç entre la fusió i fissió d'aquests<sup>21,24</sup>. Altres companys del grup ja van investigar anteriorment amb noves molècules cedides per Novartis, amb les avantatges i desavantatges que això comporta. Els medicaments i noves molècules que són investigades per les empreses farmacèutiques triguen molt de temps fins a arribar al mercat amb tota la recerca garantint la seguretat d'aquest compost per al consum humà. Per això, si es detectés un compost ja aprovat per al consum humà amb característiques activadores de la fusió seria un pas endavant molt gran en poc temps per a millorar la qualitat i expectatives de vida de molts afectats per anormalitats en les xarxes mitocondrials. Degut a això, en aquest projecte s'ha avaluat la capacitat del Honokiol, un compost ja a l'abast de tothom, com a activador de la fusió mitocondrial. Tot i això, no només volíem que millorés la morfologia de la xarxa mitocondrial, sinó que suposés a l'hora una millora funcional d'aquests orgànuls.

En les cèl·lules MEF WT el Honokiol no va induir cap canvi significatiu en la morfologia mitocondrial, encara que era observable una tendència a augmentar els mitocondris elongats tot reduint els ovalats i curts. Aquestes dades són un bon inici, ja que ens mostren que el Honokiol no té un efecte significatiu en les cèl·lules sanes *in vitro*, per tant podem suposar que tampoc el tindrà *in vivo*. Un cop amb aquestes dades inicials, es va procedir a avaluar l'efecte d'aquest compost en models cel·lulars amb knockouts de Mfn1 i Mfn2, més semblants a cèl·lules de malalts humans.

En cèl·lules MEF KO Mfn1 l'efecte del Hnk és significatiu amb un p-valor de 0.01 per a la disminució del percentatge de mitocondris ovalats i l'augment dels curts. També significativament, però amb un p-valor de 0.05, tenim un creixement dels allargats. En les cèl·lules MEF KO Mfn2 no hi ha cap canvi significatiu, amb una tendència a disminuir els ovalats i els llargs juntament amb un augment dels curts.

Tota aquesta informació ens porta a pensar que l'efecte beneficiós del Hnk és dut a terme mitjançant la proteïna Mfn2, mentre que Mfn1 no és, en aquest cas, substituït



suficient de l'acció de la primera. Això ens porta a pensar que l'efecte del Hnk necessitarà de la presència de molècules de Mfn2 per tal d'exercir la seva funció beneficiosa.

Un cop avaluat l'efecte del Hnk sobre la morfologia, i per provar que el tractament no només manté la morfologia en MEFs WT i la millora en KO per Mfn2, sinó que també millorava o mantenia l'estat bioenergètic mitocondrial, es va procedir a mesurar un seguit de mesures que ens donarien una imatge de l'estat funcional d'aquest orgànu sense i amb el tractament de Hnk. La primera d'aquestes mesures realitzades va ser el de massa mitocondrial i potencial de membrana. Dels resultats veiem que només hi ha un canvi significatiu en la massa mitocondrial en cèl·lules MEF WT, sent aquest una disminució de la massa. En les MEF KO1 una tendència a augmentar i en les MEF KO2 una tendència a disminuir que no són significatives. En relació al potencial de membrana, augmenta significativament en les MEF WT i amb tendències oposades a les de la massa mitocondrial en les altres dues. Aquest augment del potencial tot i la disminució de la massa en cèl·lules MEF WT ens indica clarament que el Hnk millora l'estat bioenergètic mitocondrial, tot i reduir la quantitat total de mitocondris presents en el cultiu sobre els quals es fan aquestes mesures. Això ens indica que el Hnk no és un compost tòxic ni perillós per a les persones, ja que els canvis sobre el potencial de membrana són petits i en cèl·lules sanes les augmenta, mentre que en les KOs el manté al mateix nivell que el control.

En aquest treball també s'ha volgut determinar el possible mecanisme d'acció del Honokiol en relació a l'elongació mitocondrial, però degut a problemes tècnics i de temps ens ha sigut impossible fer suficients Western Blots per tal de fer una quantificació correcta i amb garanties. Tot i així, hem fet WB per tal de comprovar visualment la falta de Mfn1 i Mfn2 en les cèl·lules MEF KO Mfn1 i KO Mfn2, respectivament. També s'ha avaluat els nivells d'expressió de DRP1. Tot això, prenent com a control de càrrega la proteïna  $\alpha$ -tubulina, d'un pes molecular de 55 kDa, i subunitat essencial dels microtúbuls. La seva similitud amb altres proteïnes és mínima<sup>51</sup> i és considerada una proteïna expressada per totes les cèl·lules de manera regular, pràcticament sense canvis durant transformacions en l'estat cel·lular.

Tot i que estudis previs del grup afirmen que una incubació amb Honokiol aconsegueix incrementar la expressió de Mfn2 en cèl·lules MEF WT, cal tenir en compte que aquesta es va fer a 48h. Això ens indica que el temps d'incubació és important, i que l'efecte del Hnk s'incrementa en el temps. L'absència de canvis en la expressió indicaria que el Hnk no té com a mecanisme d'acció l'expressió de proteïnes de fusió, sinó que afecta d'alguna manera a l'eficàcia o funció d'aquestes.

Un cop vam caracteritzar l'efecte del Hnk en les cèl·lules MEF, vam començar a treballar amb fibroblasts extrets d'humans que presentaven mutacions en el gen codificant per a la proteïna Mfn2. Aquesta segona part del treball tenia com a objectiu ampliar la translacionalitat de l'estudi, utilitzant unes cèl·lules més properes al pacient final que rebria el Honokiol que no uns fibroblasts de ratolí. Aquests fibroblasts han sigut cedits pel grup de la Dr. Antònia Ribes, del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic.

En aquest treball hem fet servir fibroblasts humans amb dues mutacions patogèniques naturals en el gen de la Mfn2, els 5354 tenen una duplicació d'una timina (225dupT) en heterozigosi, que una vegada transcrita i traduïda implica un codó STOP en l'aminoàcid 763. Aquesta mutació no afecta cap domini altament conservat, afectant al final de la cadena aminoacídica. Els del tipus 5339 té una substitució en homozigosi de citosina per timina, que provoca un canvi de Arginina a Triptòfan en la posició 707 de la proteïna. Aquesta mutació cau en el domini HR2 (d'heptarepeticions 2), un domini conservat i amb funció important dins Mfn2.

En la Fig. 12 de l'apartat 4.4 podem veure com afecta el Hnk a la morfologia mitocondrial en els fibroblasts F5354. Com no s'ha pogut realitzar un anàlisi estadístic, només s'han pogut observar tendències, això sí, alguna d'aquestes amb un pes important. S'ha pogut observar una tendència a l'augment de les xarxes mitocondrials tubulars. Aquesta pujada prové de una tendència a la baixa de les xarxes fragmentades. En els fibroblasts 5339 es pot observar una baixada de les xarxes mitocondrials fragmentades, que és compensada principalment, en un augment de les més elongades. També es apreciable una tendència a l'augment de les tubulars. Aquests resultats ens indiquen que el Hnk és capaç de crear una tendència a augmentar la fusió mitocondrial en ambdós tipus de fibroblasts, tot i que amb diferents nivells entre ells, en els F5354 amb menys intensitat que en els F5339.

Aquestes diferències vistes en els resultats poden ser causades per les diferents mutacions en cada tipus de fibroblast. La mutació en els fibroblasts 5339 afecta a un domini important per la funció de Mfn2, en el HR2. Aquest domini és indispensable per a acostar els mitocondris, i una mutació en aquest provoca CMT i una fusió menys eficaç<sup>37</sup>. En canvi, la mutació dels fibroblasts 5354 no afecta cap domini reconegut com a important, més enllà del HR2 que és l'últim domini abans del final de la cadena aminoacídica. La diferència en la resposta al tractament amb Hnk pot ser conseqüència de la importància o no del domini afectada per les mutacions, afavorint la fusió amb més intensitat en aquelles cèl·lules amb una fusió en pitjor estat.

En la Fig. 14 dels Resultats podem apreciar que després del tractament amb Hnk no canvia significativament la massa ni el potencial de membrana mitocondrial dels fibroblasts humans. Això ens indica que el Hnk no empitjora les condicions mitocondrials, i es podria considerar sense perill per aquest aspecte en relació al

consum general humà. En relació a la producció de ROS, si que hi observem diferències significatives. En els dos tipus de fibroblasts aquesta producció és reduïda, però amb un nivell de significació diferent: de 0.05 els 5339 i de 0.01 els 5354.

Aquests resultats ens indiquen que el Hnk tampoc empitjora l'estat mitocondrial en fibroblasts humans. Redueixen de manera significativa la producció de ROS, per tant suggereix que el funcionament de la cadena transportadora d'electrons ha sigut millorat. Aquest últim resultat concorda amb varies publicacions prèvies afirmant que el Honokiol té efectes antioxidants, i en aquest treball en tenim una prova més<sup>52-54</sup>.

També s'ha analitzat si el Hnk era capaç de millorar o mantenir la principal funció d'aquest orgànu: la respiració. L'assaig de consum d'oxigen, consultable en la Fig. 15 dels resultats, ens revela que el tractament amb Hnk redueix significativament la respiració de rutina dels dos tipus de fibroblasts, amb nivells de significació per sota de 0,05. Tot i aquesta baixada, la respiració associada amb la síntesi d'ATP no baixa tant en el cas dels 5354. La respiració màxima no es veu reduïda després de la mateixa intervenció.

En el cas dels 5339, la reducció de la rutina també porta associada una baixada significativa de la respiració associada a la biosíntesi de ATP. També la respiració màxima dels 5339 es veu reduïda significativament després del tractament amb Hnk.

Amb aquests resultats, podem afirmar que l'efecte del Honokiol en cada tipus de fibroblast és diferent, amb una millora de l'eficiència significativa en el cas dels F5354 però amb una reducció de l'estat respiratori dels F5339. Aquesta diferència de l'efecte d'una mateixa molècula en dues línies cel·lulars molt semblants pot ser atribuïble a les diferències genètiques entre elles, ja que procedeixen de dos pacients diferents, amb dues mutacions diferents en el gen de Mfn2.

Tot i que els resultats sobre la morfologia ens indiquen que el tractament amb Hnk millora la fusió mitocondrial, no es veu una millora associada en la respiració. Aquesta dissociació entre els efectes del Hnk en la fusió i la respiració ens porta a hipotetitzar que potser hi ha isoformes de Mfn2 que tenen efecte només sobre la fusió i no sobre la respiració mitocondrial. Aquesta hipòtesi es recolzada per l'article de *Segalés J et al. 2013*,<sup>55</sup> que afirma que una forma de Mfn2 sense els dos dominis transmembrana ni la cua terminal COOH- és capaç d'estimular la funció mitocondrial sense l'activitat de fusió mitocondrial. Així, és possible que el Hnk estimuli la fusió mitocondrial sense afectar la respiració d'aquest orgànu.

En resum, el tractament amb Honokiol no té efectes ni sobre les cèl·lules MEF WT ni les KO Mfn2, millorant significativament la morfologia mitocondrial de les cèl·lules MEF KO Mfn1. Tot i això, el mateix tractament no té efecte en la massa ni en el potencial de membrana d'aquests dos últims tipus cel·lulars, disminuint la massa i augmentant el potencial de les MEF WT.

El tractament amb Hnk redueix les xarxes mitocondrials fragmentades significativament en fibroblasts 5339, sent aquest canvi només una tendència en els 5354. La massa i el potencial de membrana no canvien després del tractament amb Hnk, però hi ha una reducció significativa de la producció de ROS en ambdós tipus. El tractament amb Hnk redueix significativament la respiració dels 5339 mentre que millora la eficiència d'aquesta en els de tipus 5354.

Amb aquests resultats seria prematur dir que el Honokiol és un bon activador de la fusió mitocondrial, però té altres qualitats beneficioses que han estat demostrades per estudis previs. Seria molt útil el fer més estudis amb diferents temps d'incubació, per poder determinar l'efecte d'aquest paràmetre en l'activitat del Honokiol. En aquest estudi també s'ha demostrat l'efecte antioxidant del Honokiol. En tot cas, més recerca és necessària per tal d'avaluar completament l'efecte del Honokiol sobre malalties relacionades amb disfuncions de la xarxa mitocondrial o de les proteïnes de fusió i fissió mitocondrial.

## 6. Conclusions

1. El Honokiol induïx una elongació de les xarxes mitocondrials en cel·lules MEF Mfn1 KO i en fibroblasts humans.
2. Aquest efecte del Honokiol necessita de Mfn2 per influir en la dinàmica mitocondrial.
3. Aquesta elongació mitocondrial no porta associada una millora de la respiració en el cas dels fibroblasts.
4. Depenent de les mutacions en les proteïnes de fusió de cada cèl·lula el Honokiol pot variar el seu efecte.
5. Cal més recerca per tal d'investigar molècules activadores tant de la fusió com de la funció mitocondrial.

## 7. Bibliografia

1. Online Etymology Dictionary. mitochondria | Origin and meaning of mitochondria by Online Etymology Dictionary. Available at: <https://www.etymonline.com/word/mitochondria>. (Accessed: 10th May 2019)
2. Campbell, N. A., Williamson, B., Heyden, R. J. & Pearson/Prentice Hall. *Biology : exploring life*. (Pearson/Prentice Hall, 2006).
3. Forte, M. & Blachly-Dyson, E. VDAC Channels. *IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life)* **52**, 113–118 (2001).
4. Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G. & Su, T. P. MAM: more than just a housekeeper. *Trends in Cell Biology* **19**, 81–88 (2009).
5. Bose, A. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* **139**, 216–231 (2016).
6. Hernández-Alvarez, M. I. *et al.* Deficient Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Phosphatidylserine Transfer Causes Liver Disease. *Cell* **177**, 881–895.e17 (2019).
7. Paillusson, S. *et al.* There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. *Trends in Neurosciences* **39**, 146–157 (2016).
8. Area-Gomez, E. *et al.* A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Cell Death and Disease* **9**, 335 (2018).
9. Doghman-Bouguerra, M. & Lalli, E. ER-mitochondria interactions: Both strength and weakness within cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1866**, 650–662 (2019).
10. Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L. & Green, D. R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* **13**, 1396–1402 (2006).
11. Herrmann, J. M. & Neupert, W. Protein transport into mitochondria. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 210–4 (2000).
12. Reichert, A. S. & Neupert, W. Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria—role in protein transport. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1592**, 41–49 (2002).
13. Green, D. E. & Vande Zande, H. *On the enzymic mechanism of oxidative phosphorylation (coupling unit/coupling sequences/transmembrane. orientation/phosphoryl transferase)*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, (1982).
14. Alberts, B. *et al.* *Molecular biology of the cell*. (Garland Science, 2002).
15. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2008).
16. Bereiter-Hahn, J. Behavior of Mitochondria in the Living Cell. *Int. Rev. Cytol.* **122**, 1–63 (1990).

17. Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 872–884 (2010).
18. Logan, D. C. Mitochondrial fusion, division and positioning in plants. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 789–95 (2010).
19. Rappaport, L., Oliviero, P. & Samuel, J. L. Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function. *Mol. Cell. Biochem.* **184**, 101–105 (1998).
20. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. & Prudent, J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* **62**, 341–360 (2018).
21. Sebastián, D., Palacín, M. & Zorzano, A. Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. *Trends in Molecular Medicine* **23**, 201–215 (2017).
22. Skulachev, V. P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 23–9 (2001).
23. Hales, K. G. & Fuller, M. T. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* **90**, 121–9 (1997).
24. Chen, H. *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* **160**, 189–200 (2003).
25. Chen, H., Chomyn, A. & Chan, D. C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* **280**, 26185–92 (2005).
26. Cartoni, R. & Martinou, J.-C. Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp. Neurol.* **218**, 268–73 (2009).
27. Eschenbacher, W. H. *et al.* Two rare human mitofusin 2 mutations alter mitochondrial dynamics and induce retinal and cardiac pathology in *Drosophila*. *PLoS One* **7**, e44296 (2012).
28. Meeusen, S. *et al.* Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* **127**, 383–95 (2006).
29. Delettre, C. *et al.* Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* **26**, 207–10 (2000).
30. Amati-Bonneau, P. *et al.* OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy ‘plus’ phenotypes. *Brain* **131**, 338–51 (2008).
31. Amati-Bonneau, P. *et al.* OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1855–65 (2009).
32. Chan, D. C. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 265–87 (2012).
33. Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J. M., Frey, T. G. & Chan, D. C. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3525–32 (2009).
34. Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L. & van der Bliek, A. M. Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* **12**,

- 2245–2256 (2001).
35. Friedman, J. R. *et al.* ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* (80-. ). **334**, 358–362 (2011).
  36. Zorzano, A., Sebastián, D., Segalés, J. & Palacín, M. The molecular machinery of mitochondrial fusion and fission: An opportunity for drug discovery? *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **12**, 597–606 (2009).
  37. Filadi, R., Pendin, D. & Pizzo, P. Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis.* **9**, 330 (2018).
  38. Sawyer, S. L. *et al.* Homozygous mutations in *MFN2* cause multiple symmetric lipomatosis associated with neuropathy. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5109–5114 (2015).
  39. Szigeti, K. & Lupski, J. R. Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 703–10 (2009).
  40. Braathen, G. J., Sand, J. C., Lobato, A., Høyer, H. & Russell, M. B. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. *Eur. J. Neurol.* **18**, 39–48 (2011).
  41. NIH - US. Charcot-Marie-Tooth Disease Fact Sheet | National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Available at: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-caregiver-education/Fact-sheets/Charcot-Marie-Tooth-Disease-Fact-Sheet>. (Accessed: 10th May 2019)
  42. Krajewski, K. M. *et al.* Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* **123 ( Pt 7)**, 1516–27 (2000).
  43. Vallat, J.-M., Mathis, S. & Funalot, B. The various Charcot–Marie–Tooth diseases. *Curr. Opin. Neurol.* **26**, 473–480 (2013).
  44. Mathis, S., Magy, L. & Vallat, J.-M. Therapeutic options in Charcot–Marie–Tooth diseases. *Expert Rev. Neurother.* **15**, 355–366 (2015).
  45. Miret-Casals, L. *et al.* Identification of New Activators of Mitochondrial Fusion Reveals a Link between Mitochondrial Morphology and Pyrimidine Metabolism. *Cell Chem. Biol.* **25**, 268–278.e4 (2018).
  46. Talarek, S. *et al.* Neuroprotective effects of honokiol: from chemistry to medicine. *BioFactors* **43**, 760–769 (2017).
  47. Domínguez, F. *et al.* Honokiol and magnolol production by in vitro micropropagated plants of *Magnolia dealbata*, an endangered endemic Mexican species. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 235–40 (2010).
  48. Lee, S., Khoo, C., Halstead, C. W., Huynh, T. & Bensoussan, A. Liquid chromatographic determination of honokiol and magnolol in hou po (*Magnolia officinalis*) as the raw herb and dried aqueous extract. *J. AOAC Int.* **90**, 1210–8
  49. Böhmendorfer, M. *et al.* In vitro metabolism and disposition of honokiol in rat and human livers. *J. Pharm. Sci.* **100**, 3506–3516 (2011).
  50. Liu, J. *et al.* Identification of metabolites of honokiol in rat urine using <sup>13</sup>C stable isotope labeling and liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1295**, 48–56 (2013).



51. Little, M. & Seehaus, T. Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **90**, 655–70 (1988).
52. Talarek, S. *et al.* Neuroprotective effects of honokiol: from chemistry to medicine. *BioFactors* **43**, 760–769 (2017).
53. Ramachandran, C., Wilk, B., Melnick, S. J. & Eliaz, I. Synergistic Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects between Modified Citrus Pectin and Honokiol. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2017**, 1–9 (2017).
54. Amorati, R., Zotova, J., Baschieri, A. & Valgimigli, L. Antioxidant Activity of Magnolol and Honokiol: Kinetic and Mechanistic Investigations of Their Reaction with Peroxyl Radicals. *J. Org. Chem.* **80**, 10651–10659 (2015).
55. Segalés, J. *et al.* A form of mitofusin 2 (Mfn2) lacking the transmembrane domains and the COOH-terminal end stimulates metabolism in muscle and liver cells. *Am. J. Physiol. Metab.* **305**, E1208–E1221 (2013).

## **Annex A: Descripció Detallada del Material i Mètodes**

### **A1. Tècniques de cultiu cel·lular**

#### **A1.1 Descongelació d'alíquotes cel·lulars**

##### *Reactius i Materials*

- Medi DMEM 25 mM Glc (cat n° 41966-029 Gibco), 10% FBS, Hepes 25 mM, Penicil·lina/estreptomicina 1%. Preparat a partir de 500 mL DMEM + 50 mL FBS +10 mL Hepes 1,25 M + 5 mL P/S.
- Plaques de petri de 10 cm de diàmetre estèrils
- Pipetes serològiques estèrils
- Falcons de 15 mL estèrils
- Pipetes Pasteur de vidre estèrils (per a utilitzar la bomba de buit)

##### *Mètode*

En aquest protocol es parteix d'una alíquota cel·lular congelada en medi complet i 10% DMSO, a

-80°C en un criotub, normalment de 1,5 mL (el volum del criotub pot variar, però aquesta és la capacitat més comuna):

- El criotub s'escalfa lleugerament amb les mans fins que queda un petit bloc de gel en el seu interior, moment en el que s'aboca el contingut en un falcon de 15 mL, amb 8 mL de medi temperat a 37°C prèviament. Així es minimitza el contacte de les cèl·lules amb el DMSO a temperatura ambient, reduint al mínim la citotoxicitat.
- El tub es centrifuga 3 min a 2.500 rpm.
- La totalitat del volum del tub s'aboca en una placa de petri de 10 cm de diàmetre amb 10 mL de medi temperat prèviament.
- Les cèl·lules es deixen en un incubador a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

## **A1.2 Descongelació d'alíquotes cel·lulars de cultius primaris de fibroblasts**

### *Reactius i Materials*

El mateix que en la descongelació d'alíquotes cel·lulars normals, però afegint:

- Medi CHANG, Referencia: CHANG Medium D with L-glutamine (ref.T105) de Irvine Scientific

- Medi enriquit (MEM + 15% newborn calf serum - NCS). Referencia: *Gibco 16010-159*.

Aquest procés cal que es faci molt ràpidament per tal d'evitar que es formin cristalls de gel en l'interior de les cèl·lules.

### *Mètode*

- Preparar un tub de 15 mL con 7mL de medi enriquit (MEM + 15% newborn calf serum - NCS).

- Treure el criovial del tanc de nitrogen e introduir-lo en el bany/incubador a 37°C fins que veiem que s'ha descongelat. Amb una pipeta, traspasar les cèl·lules al tub amb medi MEM+NCS.

- Homogeneïtzar amb suavitat per a que la solució s'aclareixi. Deixar reposar 8-10 minuts, completant-se la rehidratació cel·lular.

- Centrifugar 10 minuts a 1.100 rpm.

- Eliminar el sobrenedant y resuspendre el pellet en 1,8-2,2mL de medi enriquit CHANG.

- Homogeneïtzar amb suavitat.

- Traslladar la suspensió a un flascó de 25cm<sup>2</sup> i introduir aquest en l'incubador a 37°C i un 5% de CO<sub>2</sub> a l'atmosfera.

- Transcorregudes 24h realitzarem un control del bon creixement en el microscopi òptic.

### **Notes sobre la confluència de fibroblasts**

Pot resultar enganyosa. L'eficiència d'extracció de proteïnes, DNA, RNA, etc. pot resultar disminuïda si no es deixa arribar a una confluència alta. Tot i que sembli que el flascó està al 100%, els fibroblasts encara poden es poden estrènyer una mica més i seguir creixent uns dies.

## **A1.3 Congelació d'alíquotes cel·lulars**

### *Reactius i Materials*

Els mateixos que en el cas de la descongelació d'alíquotes cel·lulars normals, però afegint:

- Dimetilsulfòxid (DMSO) al 99,7%
- Tripsina: Gibco Trypsin-EDTA (0,05%), Phenol red
- PBS estèril
- Criotubs estèrils

### *Mètode*

En aquest cas es parteix d'una o diverses plaques de la línia cel·lular d'interès crescudes fins a la confluència.

- S'aspira el medi d'aquelles plaques en les que tinguem cèl·lules que volem congelar.
- Es fa un rentat amb PBS (5 mL/placa de petri de 10 cm de diàmetre) i s'aspira (així evitem l'efecte inhibitori de les proteases presents al medi de forma natural sobre l'acció de la tripsina).
- S'afegeix 1 mL de tripsina temperada prèviament a 37 °C per cada placa, repartint-la per tota la superfície de creixement.
- S'incuba 2-3 min a temperatura ambient. Es pot seguir el procés observant el cultiu en un microscopi òptic.
- Si es vol accelerar el procés, es poden fer uns cops amb els dits al fons de la placa amb compte de no perdre medi.
- En el moment en que les cèl·lules es desenganxen de la placa (aspecte arrodonit), es recullen en un 5 mL de medi temperat/placa. Cal aspirar i retornar el medi diversos cops a la placa per a acabar de desenganxar les cèl·lules de la placa i entre sí. Si es fica la placa amb cert angle de la llum de la cabina, es pot apreciar si la monocapa cel·lular s'ha després del tot o no.
- El volum s'aboca en un falcon de 15 mL i és centrifugat 3 min a 2.500 rpm.
- Es descarta el sobrenedant i el pellet es resuspèn en 1,5 mL de medi per cada criotub a generar, i com les cèl·lules s'han de congelar, s'afegeix el crioprotector DMSO a una concentració del 10%: 150 µL per cada criotub a generar.

- La solució obtinguda es posa en els criotubs convenientment retolats i es porta ràpidament al congelador de -80°C, per a minimitzar l'exposició de les cèl·lules al DMSO a temperatura ambient.

#### **A1.4 Tripsinització, dilució de cèl·lules i comptatge cel·lular**

##### *Reactius i Materials*

Els mateixos que en el punt anterior, excepte el DMSO i afegint-hi:

- Cambra de Neubauer
- Tint Blau tripà 0,4%, Ref. 15250-061 Gibco InvitrogenTM

##### *Mètode*

En aquest protocol es parteix d'un cultiu cel·lular amb un estat proper a la confluència (o no, depèn dels interessos de l'experiment), en el que l'objectiu és generar una segona placa amb una densitat cel·lular inferior, per evitar els problemes relacionats amb la falta d'espai.

- S'aspira el medi d'aquelles plaques en les que tinguem cèl·lules que volem diluir.
- Es fa un rentat amb PBS (5 mL/placa de petri de 10 cm de diàmetre) i s'aspira.
- S'afegeix 1 mL de tripsina temperada prèviament a 37 °C per cada placa, estenent-la per tota la superfície de creixement.
- S'incuba 3-4 min a temperatura ambient. Es pot seguir el procés observant el cultiu en un microscopi òptic.
- En el moment en que les cèl·lules es desenganxen de la placa (aspecte arrodonit), es recullen en un volum de medi temperat variable, per exemple 10 mL/placa.
- Cal aspirar i retornar el medi diversos cops a la placa per a acabar de desenganxar les cèl·lules de la placa i entre sí.
- El volum s'aboca en un falcon de 15 mL.
- Els recipients destí s'omplen amb el volum de medi recomanat en cada cas, a l'espera de que afegim les cèl·lules.

Una vegada tenim totes les cèl·lules de la placa recollides en aquest volum de medi, és quan cal fer la dilució d'aquestes. Per començar, si la superfície de la placa a diluir és la mateixa que la placa destí, el procés es pot portar a terme de dues maneres:

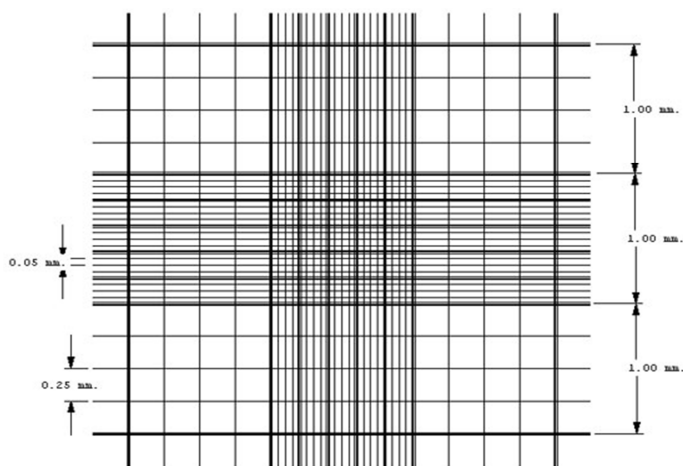
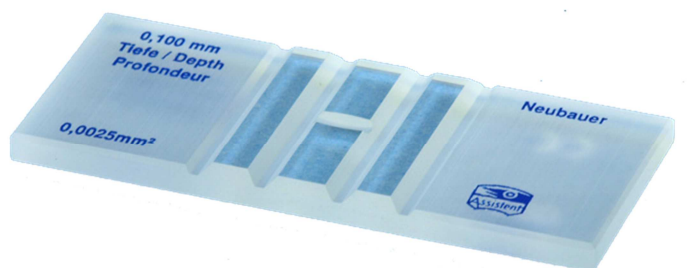
**Per aproximació:**

En el cas de les MEF amb les que he treballat, sabem que una placa de petri de 10 cm de diàmetre conté aproximadament  $6 \cdot 10^6$  cèl·lules. Si les recollim en 10 mL i volem fer una dilució 1/10, caldrà afegir 1 mL en el següent recipient, posant doncs 600.000 cèl·lules.

**Amb comptatge cel·lular (procediment més exacte i correcte):**

De la solució en la que hem recollit les cèl·lules, caldria prendre'n una mostra de poc volum ( $20 \mu\text{L}$ ), les comptaríem amb cambres de comptatge com la de Neubauer, de la que he inclòs una imatge en la Fig. A1. En aquest segon cas, es posaria un cobreobjectes sobre la cambra, i es podria carregar un volum de  $10 \mu\text{L}$  d'aquesta mostra (o d'una dilució d'aquesta si està molt concentrada) que és el que cap en cada àrea de comptatge. Ara, sota el microscopi òptic es comptarien les cèl·lules de cada

regió "L" de la imatge, descartant la meitat de les cèl·lules que toquin les línies que limiten aquesta regió (és a dir, que a l'hora de comptar les cèl·lules que es trobin sobre els límits de l'àrea "L", només es compten les de dos costats, per exemple el dret i l'inferior). Fent la mitjana de les quatre regions, aplicant correccions per la dilució feta i multiplicant per 10.000 (per assolir el volum d'1 mL), obtindríem el nombre de cèl·lules per mL: **Nombre de cèl·lules / mL = mitjana (L1 a L4) \* 10.000 \* factor de dilució aplicat.**



**Figura A1: Cambra de Neubauer.** A sota, detall d'una de les dues àrees de comptatge de les que compta

Si a més ens interessa determinar la viabilitat de la suspensió cel·lular, dels  $20 \mu\text{L}$  es faria una dilució  $\frac{1}{2}$  amb Blau Tripà, que tenyeix les cèl·lules mortes de blau. A l'hora de fer els càlculs doncs, caldrà tenir en compte aquesta dilució extra feta (es multiplica el resultat x2):

**Concentració de cèl·lules totals (número de cèl·lules totals / mL):**

Conc. total (cel/mL) = mitjana de cèl·lules (totals) \* 10<sup>4</sup> \* f. de dilució aplicat \* 2

**Concentració de cèl·lules viables (número de cèl·lules viables / mL):**

Conc. viables (cel viables / mL) = mitjana de cèl·lules viables (blanques) \* 10<sup>4</sup> \* f. de dilució \* 2

**Viabilitat (%) = (conc viables / conc totals) \* 100**

Una vegada realitzats aquests comptatges, s'afegeix el volum que contingui el nombre de cèl·lules vives necessari al següent recipient (aquí cal tenir en compte la viabilitat del cultiu).

Si en canvi, la superfície no és exactament la mateixa entre els recipients origen i destí, també cal tenir en compte el canvi d'àrea en la dilució. **Un exemple del càlcul que caldria fer seria:** imaginem que hem recollit les nostres cèl·lules en 10 mL de medi, i després de fer el comptatge, sabem que tenim aproximadament 6\*10<sup>6</sup> cèl·lules en total. D'aquestes, volem fer una dilució 1/10. Si el pas fos entre dos recipients de la mateixa superfície (de 56 cm<sup>2</sup> a 56 cm<sup>2</sup>), la dilució es faria posant 600.000 cèl·lules (10 % del total de 6\*10<sup>6</sup>) en la següent placa. Però si volem passar les cèl·lules d'un recipient de 56 cm<sup>2</sup> a un de 2 cm<sup>2</sup> per exemple, caldrà posar-ne menys per assolir una dilució 1/10, ja que si poséssim el mateix volum que entre dos recipients d'àrea equivalent, la densitat cel·lular en el pouet seria superior a la desitjada (per suposat per sobre del 10% que nosaltres intentem assolir amb aquest càlcul):

*10 mL en els que hem recollit el cultiu = 6\*10<sup>6</sup> cèl·lules*

*Mantenint l'àrea de cultiu, si volem fer una dilució 1/10 cal dividir els 10 mL en que recollim les cèl·lules entre 10 = 1 mL de la solució = conté un 10% del cultiu = 600.000 cèl·lules*

*Si en canvi volem fer la dilució 1/10 en una àrea de 2 cm<sup>2</sup> partint d'una de 56 cm<sup>2</sup>, cal fer una regla de tres, representada en el següent factor de conversió: si en 56 cm<sup>2</sup> caldria posar 600.000 cèl·lules, en 2 cm<sup>2</sup> caldria posar-ne 21.400 aproximadament.*

$$2 \text{ cm}^2 \times \frac{600.000 \text{ cèl} \cdot \text{lules}}{56 \text{ cm}^2} = 21.429 \text{ cèl} \cdot \text{lules}$$

*Ara, sabent que en cada mL de medi en el que hem recollit les cèl·lules hi tenim 600.000, aleshores cal afegir en el pouet de 2 cm<sup>2</sup> el següent volum:*

$$21.429 \text{ cèl} \cdot \text{lules} \times \frac{1 \text{ mL dilució}}{600.000 \text{ cèl} \cdot \text{lules}} \times \frac{10^3 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} =$$

***35, 7 μL de solució a afegir en cada recipient de 2 cm<sup>2</sup>***

Finalment, una vegada transferides les cèl·lules, els cultius es deixen en un incubador a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

## A2. Microscopia Confocal

En el punt a continuació explicaré la tècnica mitjançant la qual he pogut observar les cèl·lules i l'efecte sobre la morfologia mitocondrial que tenia el compost aplicat. Cal remarcar però, que tot i que les tincions que s'han utilitzat en aquest projecte podrien ser detectades per microscòpia de fluorescència, és més adequat utilitzar la microscòpia confocal, donat que permet obtenir imatges definides a diferents alçades de la mateixa, obtenint diferents seccions, que després es poden superposar per a obtenir una imatge global i amb major aproximació a la forma tridimensional dels orgànuls. Això era necessari donat que els mitocondris fusionats poden allargar-se en qualsevol direcció de l'espai, i per a veure'ls sencers es necessita fer fotos a diferents alçades.

A més, també convé destacar que la microscòpia confocal i tots els processos de "imaging" són molt versàtils, de forma que aquí només descriuré el protocol que he seguit jo per a observar les meves cèl·lules.

### *Reactius i Materials*

- Medi DMEM 25 mM Glc (cat n°41966-029 Gibco), 10% FBS, Hepes 25 mM, Penicil·lina/estreptomicina 1%. Preparat a partir de 500 mL DMEM + 50 mL FBS +10 mL Hepes 1,25 M + 5 mL P/S.
- Plaques de 6 pouets de Corning Inc, ref. 3516.
- Pinces estèrils
- Cobre-objectes de 22 mm de diàmetre estèrils
- Pipetes serològiques estèrils
- Falcons de 15 mL estèrils
- Pipetes Pasteur de vidre estèrils (per a utilitzar la bomba de buit)
- Tripsina: Gibco trypsin-EDTA (0,05%), Phenol red
- PBS
- Sonda de marcatge mitocondrial MitoTracker Deep Red9
- Tint fluorescent DAPI5: *DAPI Nucleic Acid Stain* de Invitrogen™
- Microscopi confocal Zeiss LSM 780
- ImageJ image analysis software



## Mètode

- Inicialment, cal preparar, temps abans de l'observació al microscopi, les mostres cel·lulars. Normalment es parteix d'un cultiu previ de les cèl·lules que es vulguin observar, i es tripsinitzen, tal com s'explica en l'apartat 4 d'aquest annex. Després, se sembren en plaques de 6 pouets (més o menys plaques en funció del nombre de mostres/condicions que es vulguin observar), posant en cadascun dels pouets un cobre-objectes estèril amb l'ajuda d'unes pinces també estèrils i 2 mL de medi. Si els cobre-objectes que es tenen en el laboratori no ho són, es poden deixar els necessaris dins una placa de petri sota la llum UV de la campana de flux laminar durant 20 min, i queden esterilitzats.

- Aquí cal tenir en compte quan de temps passarà des de la sembra fins a la observació (1, 2, 3 dies,...) , el canvi de superfície entre els recipients origen i destí de les cèl·lules, i en quina densitat final volem que estiguin les cèl·lules al observar-les (normalment s'intenta que no estiguin en confluència, aproximadament créixer-les fins un 60% de la capacitat de la placa permetria prendre bones imatges), i en funció de tot això i de la velocitat de creixement del tipus cel·lular concret amb el que treballem, caldrà fer una major o menor dilució de les cèl·lules sembrades. Acabat aquest procés es deixen créixer les cèl·lules en un incubador a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

- També cal tenir en compte si les cèl·lules necessiten una incubació amb algun compost com ens passa en aquest projecte, i el temps que ha de durar aquesta. En aquest cas les incubacions amb els compostos duren 24h, així que després de sembrar (procés que jo normalment porto a terme dos dies abans de l'observació), 24h abans d'anar al confocal es porta a terme un canvi de medi dels pouets, en que es posin en contacte amb els compostos en la concentració desitjada.

- Arribat el dia de la observació, les cèl·lules hauran crescut no només sobre la placa, sinó també sobre el cobre-objectes, i en aquest moment, és quan es preparen les mostres per a fotografiar-les, també en la campana de flux laminar com tota la resta de la manipulació feta fins aquest punt:

1. Es dilueix la sonda MitoTracker Deep Red pel marcatge de les mitocondries en medi fins a una concentració de 50 nM, i del DAPI (tint fluorescent que marca els àcids nucleics del nucli de les cèl·lules) es fa una dilució 1/10.000 en el mateix medi. El volum final que ha de tenir aquesta solució depèn del nombre de pouets/mostres que pretenguem observar: cal calcular que per cada pouet es necessiten 2 mL de solució.

2. Es retira el medi antic de les cèl·lules amb la bomba de buit, es fa un rentat amb PBS (de forma opcional si el medi en el que diluïm els tints són el mateix que estem retirant) i s'afegeix la solució acabada de preparar.

3. S'incuben les cèl·lules durant 30 minuts en l'incubador a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.
4. Una vegada acabada la incubació, es retira el medi, es fa un rentat amb PBS dels pouets (per a evitar un marcatge excessiu de les cèl·lules amb les sondes) i s'afegeix 2 mL de medi fresc en cada pouet.
5. Immediatament després, i protegint les cèl·lules de la llum el màxim possible, es porten les mostres al microscopi confocal.

- Allà, els cobre-objectes es van posant un a un en unes cambres d'observació metàl·liques, col·locant cada cobre-objectes entre les dues peces metàl·liques i enroscant, fins que la meitat superior sigui estanca. En tal situació, es posen uns 400 µL de medi sobre el cobre, cosa que permet mantenir les cèl·lules vives durant més temps. La resta de mostres es poden mantenir en un incubador fins al moment de la seva observació (tenint en compte que quan més temps passi, més es perd la tinció).

- Una vegada preparada la mostra, es programa el microscopi (amb el software que porta incorporat) per a que tingui preparats dos làsers d'excitació diferents: un de 358 nm (UV), que és el màxim d'excitació del DAPI i fa que emeti a 461 nm (blau), i un de 644 nm (vermell), que és el màxim d'excitació del MitoTracker, que emet a 665 nm (vermell, proper al vermell llunyà).

- Les mostres s'observen en objectius d'oli de 63 augments, que és l'ampliació adequada per a veure clarament la morfologia mitocondrial. Per tant, abans de posar la mostra, cal afegir una gota d'oli sobre l'objectiu.

- Amb tot preparat, es localitzen les cèl·lules (el grup que ens interressi) usant els oculars del microscopi amb una il·luminació que exciti el DAPI, i quan trobem la posició que volem fotografiar, li diem al software que faci una fotografia estàtica amb els dos làsers a la vegada, el qual ens permetrà veure tant les mitocondries com el nucli de cada cèl·lula.

- Com a resultat obtenim fotos en les que es pot visualitzar el DAPI nuclear en blau i el MitoTracker marcant els mitocondris en vermell, i usant programes d'anàlisi d'imatge com *l'ImageJ* aquestes fotos es poden superposar i obtenir la visió completa dels mitocondris de la que parlàvem en la introducció d'aquest apartat.

- Tot aquest procés es repetiria per a cada cobre-objectes dels que hem preparat, obtenint així fotos de cadascuna de les condicions.

- A continuació cal comptar manualment les cèl·lules i classificar-les segons tinguin uns mitocondris ovalats, curts o allargats.

### A3. Citometria de Flux

En aquest quart apartat descriuré els materials i protocol fets servir per a realitzar una citometria de flux, amb la que al llarg del projecte he mesurat múltiples paràmetres. És per això que primer explicaré què són, com funcionen i què mesuren cadascuna de les sondes utilitzades concretament, i després especificaré el protocol i materials a nivell general que fan falta per a fer la mesura (que en la majoria dels casos és la mateixa).

#### *Reactius i Materials*

- Medi DMEM 25 mM Glc (cat n° 41966-029 Gibco), 10% FBS, Hepes 25 mM, Penicil·lina/estreptomicina 1%. Preparat a partir de 500 mL DMEM + 50 mL FBS +10 mL Hepes 1,25 M + 5 mL P/S.
- Plaques de 12 o 24 pouets (en aquest cas es posarà l'exemple de 24, però els processos són equivalents)
- Pipetes serològiques estèrils
- Falcons de 15 mL estèrils
- Pipetes Pasteur de vidre estèrils (per a utilitzar la bomba de buit)
- Tripsina: Gibco trypsin-EDTA (0,05%), Phenol red
- PBS
- Honokiol
- Gallios™ Flow Cytometer
- Sondes de marcatge (TMRM, MitoTracker Deep Red, CellROX)

#### **A3.1 Sonda Tetrametilrodamina (TMRM) (#M20036) d'Invitrogen:**

El TMRM és una sonda fluorogènica permeable a les membranes plasmàtiques i mitocondrials que s'acumula a l'interior de mitocondris actius amb el potencial de membrana intacte, a causa de que l'entrada de la molècula en l'òrganul està impulsat per aquest potencial, deixant-los marcats amb fluorescència. Es fa servir doncs per a mesurar el potencial de membrana mitocondrial, on, quan més gran, més senyal lumínic s'emet perquè s'acumula més sonda, i quan el potencial baixa o es perd, l'acumulació no és tan important i el senyal disminueix. Concretament té un màxim d'absorció en 488 nm i un màxim d'emissió de 574 nm. La concentració final (en cultiu) de treball d'aquesta sonda és de 250 nM, però pot variar segons el tipus cel·lular.

### A3.2 Sonda MitoTracker Deep Red (#M22426) d'Invitrogen:

El MitoTracker Deep Red és una sonda fluorogènica i permeable a les membranes citoplasmàtiques i mitocondrials que conté una fracció clorometil lleugerament tiol-reactiva que serveix per a marcar els mitocondris, ja que la molècula és capaç de difondre passivament a través de les membranes i acumular-se en aquests orgànuls actius. També fan servir el potencial de membrana per a entrar dins aquests organuls, i si aquests no estiguessin actius, els mitocondris no es marcarien. Existeixen versions que només serveixen per tenyir aquests orgànuls en cèl·lules vives i d'altres que mantenen el marcatge inclús després d'una fixació. A diferència de l'anterior sonda però, l'entrada d'aquesta no és proporcional al potencial mitocondrial (tot i que el requereix per a entrar) sinó a la quantitat d'orgànuls que hi ha, o el que s'anomena la **massa mitocondrial**. Aquest és l'aspecte que queda mesurat amb aquesta sonda. La raó de que tingui aquest comportament tot i dependre del potencial, és que quan entra dins el mitocondri, s'hi queda, mentre que en el cas del TMRM, si el potencial baixa, la sonda surt de l'orgànul. Té un màxim d'absorció en 644 nm i un màxim d'emissió en 665 nm. Les concentracions de treball d'aquesta sonda varien entre 25 i 500 nM, però per a les cèl·lules MEF la concentració ideal és la de 50 nM.

### A3.3 Sonda CellROX Red (# C10422) d'Invitrogen:

El CellROX Deep Red és una sonda fluorogènica permeable a les membranes citoplasmàtiques i mitocondrials que al entrar a la cèl·lula es dirigeix ràpidament i de forma selectiva als mitocondris, a causa de que s'oxida per l'acció del Superòxid, tipus de ROS la producció del qual és pràcticament exclusiva d'aquest orgànul. Al patir l'oxidació, el tint adquireix fluorescència vermella mesurable, i com que reacciona específicament amb el superòxid (cap altre ROS ni RNS), permet mesurar la quantitat de ROS produïts per acció de la funció mitocondrial exclusivament (sense tenir en compte el que pugui passar a la resta de la cèl·lula), cosa que en el nostre projecte ens serà especialment útil a l'hora de testar l'estat real d'aquests orgànuls. Té un màxim d'absorció de 644 nm i un màxim d'emissió de 665 nm. La concentració final de treball d'aquesta sonda és de 5  $\mu$ M.

#### *Mètode*

El protocol a seguir per a realitzar aquests assajos de citometria de flux amb sondes és equivalent sigui quina sigui la molècula utilitzada. És per això que en aquest cas explicaré el protocol seguit per a un cas concret, el de la mesura simultània de potencial de membrana mitocondrial i la massa mitocondrial (per a normalitzar el primer element amb el segon). He escollit aquest perquè és el més complicat, amb controls que només s'utilitzen en aquest cas. En la Fig. A7 s'indica un exemple d'organització dels pouets per a fer tal mesura:

- Primer cal sembrar una placa de 24 pouets (o de 12) amb les cèl·lules que vulguem testar, en tot cas, que siguin com a mínim 2 pouets per cada condició, per a tenir rèpliques. Com sempre, la dilució de les cèl·lules s'ha de fer tenint en compte la velocitat de creixement de les cèl·lules, el canvi de superfície i quants dies transcorreran des del moment en el que es prepari la placa fins que es llegeixi el resultat en el Citòmetre, moment en el que les cèl·lules haurien d'estar entre un 90 i 100 % de confluència.

- Si a més cal fer alguna incubació amb un compost, caldrà realitzar un canvi de medi les hores necessàries abans de llegir el resultat, que en el meu cas han sigut 24 hores.

- Arribat el dia de la citometria, cal preparar les mostres amb entre 1 i 1,5 hores d'antelació (**NOTA:** a poder ser, tot el protocol hauria de fer-se en una campana de flux laminar, per evitar contaminacions i a les fosques, per a mantenir les sondes fluorescents estables), perquè cal seguir els següents passos si **volem mesurar el potencial de membrana i la massa mitocondrial:**

1. Inicialment cal generar dilucions de la sonda TMRM a concentració final 250 nM i de la sonda MitoTracker a concentració final 50 nM en medi fresc com a solvent.

2. Es pren la placa de cèl·lules que ha estat creixent durant els últims dies i es canvia el seu medi per les solucions acabades de preparar, seguint la organització que hagim decidit abans, excepte en el cas dels blancs, en que no se li afegirà sonda per a tenir una mostra negativa, sense marcatge i per tant tampoc cal canviar-li el medi. A l'hora de fer el canvi de medi, es recomana fer un rentat amb PBS.

3. La placa s'incuba a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> durant 30 minuts amb les sondes determinades.

4. Transcorregut el temps, es recupera la placa, i es retira el medi de tots els pouets aquest cop, seguit de com a mínim un rentat amb PBS per a assegurar-nos el bon funcionament de la tripsina.

5. A continuació cal aixecar les cèl·lules de la placa amb una tripsinització: s'afegeixen 50 µL de tripsina prèviament temperada a 37°C a cada pouet, en el cas de les plaques de 24. En les de 12 fan falta uns 100 µL per cada pouet. Es deixen transcórrer entre 2 i 4 minuts per a que les cèl·lules es desenganxin de la placa.

6. A cada pouet s'afegeixen 450 µL de medi per a aturar la reacció, i es recullen, una a una, les mostres de 500 µL en eppendorfs prèviament retolats. En aquest cas cal actuar de la mateixa forma que amb una placa gran: per acabar de

desenganxar les cèl·lules de la placa és necessari absorbir el medi amb la pipeta i retornar-lo amb força a la placa.

7. Les mostres immediatament després es porten a l'equipament de citometria, i es recomana protegir-les amb paper de plata de la llum, per evitar que les sondes es facin malbé.

8. Una vegada allà, les mostres es traspassen a vials específics del Citòmetre, l'aparell es programa amb el protocol a seguir (cada sonda té un protocol, perquè cadascuna necessita uns làsers de longituds d'ona concrets), i es mesuren les fluorescències mitjanes de cadascuna, que en aquest cas és el que ens interessa, encara que el Citòmetre pot mesurar moltíssims paràmetres més.

### **Interpretació del resultat, càlculs i normalitzacions de les mesures de fluorescència del citòmetre de flux:**

Una vegada acabat l'assaig i obtinguts els resultats numèrics de la quantitat de fluorescència en cada mostra, cal tenir en ment que **aquests valors sempre són relatius**. És a dir, que a l'hora de calcular els resultats finals, el més adient és usar altre cop un full de càlcul Excel, on hem de tenir en compte els següents aspectes:

- El blanc és necessari a l'hora de fer la mesura en el Citòmetre, per a diferenciar una mostra negativa, sense tinció, per a indicar a l'aparell a partir de quin valor la fluorescència detectada deixa de ser la intrínseca de les cèl·lules i està causada per la sonda.

- Cal establir un control negatiu intern que considerem com a valor basal, en el nostre cas, es prenen els valors que apareguin en cada assaig de les cèl·lules WT sense cap tipus de tractament, i aquestes s'igualen a 1, normalitzant la resta de valors d'altres condicions i tipus cel·lulars en funció d'aquests primers. Això permet evitar les variabilitats de tinció (molt comuns) que es poden donar entre un assaig i el següent.

A més, si l'assaig de citometria vol mesurar el potencial de la membrana mitocondrial, cal corregir les dades:

- El potencial cal corregir-lo en funció de la massa mitocondrial trobada en l'assaig (dividint un valor normalitzat entre l'altre normalitzat també, sempre respecte la mostra WT control), per a obtenir el potencial per unitat de massa mitocondrial, informació molt més vertadera de l'estat i qualitat d'aquest orgànul.

#### A4. Tècniques de Western Blot

En aquest apartat descriuré tot el conjunt de tècniques necessàries per a realitzar un western blot, així com el protocol del western pròpiament dit, que permetrà analitzar l'expressió proteica de les cèl·lules en cultiu en unes condicions determinades.

##### A4.1 Generació d'extractes cel·lulars totals o lisats totals

###### *Reactius i Materials*

- Cultius cel·lulars d'interès crescuts en plaques de 6 pouets (1,73 cm Ø, 9,5 cm<sup>2</sup>/pouet) o en plaques de Petri de 6 cm de diàmetre
- Gel
- Espàtula estèril
- PBS
- Tampó de lisi: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, inhibidors de fosfatases (2 mM Ortovanadat de sodi, 50 mM NaF i 20 mM pirofosfat de sodi) i inhibidors de proteases (una tableta cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail 04693159001 ROCHE per cada 10 mL de tampó).
- Xeringa de 20 Gauges (0,81 mm de gruix)
- Pipetes automàtiques i puntes estèrils

###### *Mètode*

Partint dels cultius cel·lulars d'interès, amb aquest protocol obtindrem un extracte de proteïnes total de les cèl·lules per al seu posterior anàlisi en western blot. El procés es pot dur a terme en condicions de no esterilitat.

- Les plaques es mantenen sobre una superfície plana i freda, normalment una peça metàl·lica amb gel a sota. En aquesta posició, es retira el medi de les plaques i se'ls fa un rentat amb PBS.
- S'afegeixen 200 µL de tampó de lisi en cada placa de 6 cm de diàmetre o en cada pouet d'una placa de 6.
- Utilitzant una espàtula nova per cada mostra diferent, es recullen les cèl·lules, aixafant-les i arrancant-les de la placa, procés que s'aconsegueix arrossegant amb força l'instrument sobre la superfície on es troben les cèl·lules (scraping o raspat amb espàtula).

- El tampó ara contindrà una suspensió de fragments cel·lulars, que es recull amb l'ajuda de la pipeta automàtica en diferents eppendorfs, que es mantenen en gel a 4°C.
- Amb la xeringa s'homogeneïtza la mostra, aspirant i retornant a l'eppendorf el tampó uns 12 cops, cosa que permet un major trencament cel·lular.
- Se centrifuguen les mostres 10 min a 700xg i 4°C i es recuperen els sobrenedants, que contindran les proteïnes de tota la cèl·lula (donat que és un lisat total), en nous eppendorfs perfectament retolats. Els pellets, que contenen cèl·lules no lisades i d'altres fragments grans, es descarten.
- Les alíquotes es guarden a -20°C fins l'hora de fer el Western.

#### A4.2 Quantificació proteica dels extractes mitjançant BCA

##### *Reactius i Materials*

- Pack comercial de quantificació proteica amb BCA: *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*
- Placa de 96 pouets
- Espectrofotòmetre de lectura de plaques de 96 pouets: *Tecan Sunrise 96-well Microplate Reader*
- Incubador a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>
- Solució d'Albúmina Sèrica Bovina (BSA) 1mg/mL
- Pipetes automàtiques i puntes estèrils

##### *Mètode*

A partir dels extractes produïts en el punt anterior, es quantifica, amb el protocol que explicaré a continuació, la concentració de proteïna que tenim en cada extracte. Tal informació ens servirà després per a carregar una concentració proteica equivalent en cada pouet, permetent que els canvis en quantitat de la proteïna d'interès observats en el resultat es deguin únicament a canvis d'expressió i no a la quantitat de proteïna carregada.

- En la placa de 96 pouets, i amb l'organització preferida, es posen 0, 2,5, 5, 10 i 20 µL d'Albúmina 1mg/mL, obtenint respectivament quantitats de 0, 2,5, 5, 10 i 20 µg de proteïna en els diferents pouets. Normalment tal organització es fa per duplicat, obtenint així dues dades per cada concentració que permetin després traçar la recta patró.



- En d'altres pouets, amb la organització preferida també, es carreguen entre 2 i 10  $\mu\text{L}$  de l'extracte cel·lular, volum que ha de ser constant en tots els pouets carregats però que varia en cada experiment en funció de les cèl·lules utilitzades. Normalment de cada extracte s'afegeixen dos pouets, per a tenir una rèplica de cada resultat.
- Es prepara el volum adequat de reactiu BCA, tenint en compte que necessitarem uns 200  $\mu\text{L}$ /pouet, barrejant el dissolvent que ens proporciona el pack comercial amb el reactiu concentrat 50x.
- S'afegeixen 200  $\mu\text{L}$  de la solució 1x a cada pouet i s'incuba la placa uns 15 min a 37°C.
- En aquest temps, la coloració haurà virat sent més intensa en aquells pouets on hi hagi més proteïna. Tal intensitat aleshores es podrà llegir en un espectrofotòmetre adaptat a plaques de 96, en el nostre cas, el *Tecan Sunrise 96-well Microplate Reader*.
- Amb les dades de l'albumina, es traça una recta patró que relacioni l'absorbància registrada amb la concentració o quantitat proteica carregada, permetent doncs interpolar l'absorbància de les mostres problema en tal recta i obtenint la quantitat de proteïna de cadascuna. Si ara dividim la quantitat de proteïna mesurada entre el volum de mostra afegit al pouet, obtenim la concentració proteica de cada extracte, informació que ens permet carregar els mateixos  $\mu\text{g}$  de proteïna en cada pouet.

#### **A4.3 Western Blot: preparació dels gels, electroforesi, transferència, immunodetecció, revelatge i quantificació**

##### *Reactius i materials*

- BioRad Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell (aparell i material d'electroforesi)
- Font de corrent i voltatge
- Eppendorf ThermoStat (escalfador d'ependorfs)
- Solució Acrilamida/Bis-acrilamida (relació 37,5/1) 30% (p/v)
- Tampó Tris HCl 1,875 M pH 8,8
- Tampó Tris HCl 0,5 M pH 6,8
- SDS 10% (p/v)
- Persulfat amònic (APS) al 10% (p/v)
- Tetrametiletildiamina (TEMED)
- Aigua destil·lada
- Isopropanol

- Tampó de càrrega Laemmly LSB 4x
- Ditiotreitòl (DTT) 20x
- Tampó d'electroforesi (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3). Estoc 10x.
- Solució de marcadors de pes molecular: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder de ThermoFisher Scientific™
- BioRad Mini Trans-Blot Cell III (aparell i material de transferència)
  
- Tampó de transferència (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, 20% v/v metanol, pH 8,3). Estoc 10x.
- Metanol
- Membrana PVDF
- Papers Whatman
- Solució de rentat: PBS-tween (PBS + tween 20 al 0,1%)
- Solució de bloqueig (PBS-tween + llet en pols al 5% p/v)
- Anticossos primaris
- Anticossos secundaris conjugats a HRP
- Films fotogràfics: Fuji Super RX-N Blue Film 18×24 cm de Fujifilm
- Reactiu de revelatge: Luminata™ Classico Western HRP Substrate de la casa comercial Millipore
- Cassete de revelat: X-ray film cassette de Wolf X-ray Corporation
- Revelador automàtic HYPERPROCESSOR de GE Healthcare Life Sciences
- Quantity One 1-D Analysis Software

### *Mètode*

En aquest protocol descriuré tot el procediment a seguir per a fer el western blot, des de la generació dels gels i primera electroforesi, fins la quantificació dels resultats. Aquest procediment es basa en el que es pot trobar a la literatura<sup>12</sup>, però amb certes modificacions adequades a les proteïnes en les que tenim interès. Podríem dividir el procés en les següents etapes:

### **Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida i SDS (SDS-PAGE)**

- Es munten els cristalls d'1,5 mm de gruix en els suports i es col·loquen sobre les esponges, assegurant que estiguin ben ajustats i no tinguin pèrdues, podent inclús assegurar la posició blocant les pinces subjectores amb d'altres elements, com puntes de pipeta automàtica.

- A continuació es prenen dos falcons de 50 mL, en els que es prepararan els dos tipus de gel: en un el separador (resolving o running) i en l'altre el concentrador (stacking). Per cada gel separador a preparar, i en funció del % de concentració del gel, es mesclen els següents volums de reactius (és a dir, que en el cas de voler fer dos o tres gels, cal multiplicar els volums per dos o per tres respectivament) i en el cas del gel concentrador, el % és sempre el mateix:

Gel Separador (Resolving)	7,5% Acrilamida	10% Acrilamida
H2O destil·lada	4,8 mL	4,05 mL
Acrilamida 30%	2,25 mL	3 mL
Tampó Tris HCl 1,8 M pH 8,8	1,8 mL	1,8 mL
SDS 10%	90 µL	90 µL
APS 10%	30 µL	30 µL
TEMED	4,5 µL	4,5 µL

Gel Apilador (Stacking)	6% Acrilamida
H2O destil·lada	1,7 mL
Acrilamida 30%	0,5 mL
Tampó Tris HCl 1,8 M pH 8,8	0,25 mL
SDS 10%	25 µL
APS 10%	8,5 µL
TEMED	2,5 µL

*Taules A1 i A2. Volums necessaris dels diferents reactius per a fer gels PAGE-SDS. Gel separador (9 mL totals) a les diferents concentracions utilitzades. A sota, els volums per fer un de concentrador (2,5 mL totals), sempre al 6%. El gruix d'aquests gels és de 1,5 mm. Cedit per David Sebastián.*

- S'afegeixen tots els reactius dels dos tipus de gels excepte l'APS i el TEMED, perquè en el moment en que s'incloguin en la mescla, aquesta polimeritzarà. És per això, que ara només s'afegeixen aquests dos reactius en la mescla de gel separador, es barreja suaument, i immediatament es comença a carregar la solució entre els vidres. No cal introduir els 9 mL de mescla preparada en cada gel, només el suficient per a que arribi fins la marca verda del suport.

-Sobre els gels preparats s'afegeix isopropanol per a donar una forma recta a l'extrem superior del gel i evitar l'entrada d'oxigen (que inhibeix la polimerització) i es deixa desenvolupar la reacció durant uns 20-30 minuts.

- Passat aquest temps, l'alcohol es llença per decantació i se'n netegen les restes en els vidres amb paper de filtre.

- A la solució del gel concentrador s'afegeixen l'APS i el TEMED, es barreja suaument, i immediatament es carreguen sobre els gels separadors, fins dalt de tot dels vidres. Es col·loquen a sobre les pintes per a formar els pouets, sense deixar bombolles, i es deixa polimeritzar el gel 15-20 minuts.

- Una vegada acabada la reacció, els gels es poden guardar, sense treure la pinta, a 4°C fins l'endemà, embolicats en paper de filtre humitejat i tot empaquetat en paper d'alumini. O bé es poden utilitzar immediatament.

- En aquest punt, es poden començar a **preparar les mostres per a carregar**: es recuperen els extractes fets tal com s'explica al punt 7.1 d'aquets annex, i es posen en gel, per a que es descongelin però segueixin en fred.

- A partir dels càlculs de concentració proteica del punt 7.2 d'aquest annex, es calcula el volum de cada mostra a carregar en cada pouet per a assolir una mateixa quantitat de proteïna. A més, cal barrejar la mostra amb tampó de càrrega LSB mesclat amb DTT. El segon és un agent reductor que trençarà els ponts disulfur de les proteïnes i permetrà una major desnaturalització d'aquestes, i es dilueix 20 cops en el primer (1 mL LSB + 50 µL DTT), que conté glicerol per dotar de major densitat a la mostra i de blau de bromofenol per a poder seguir-la mentre avança en el gel. Una vegada tenim la mescla, aquesta s'ha de diluir 4 cops per assolir la concentració de treball, cosa que s'aconsegueix al barrejar-la amb la mostra i si s'escau, aigua destil·lada (és a dir, ¼ de la solució ha de ser aquest tampó i la resta mostra o mostra + aigua).

**NOTA:** no cal que totes les mostres tinguin el mateix volum, el que importa és que els µg de proteïna de cadascuna carregats en el gel siguin els mateixos. Per aquesta mateixa raó, barregem o no aquestes mostres amb aigua, la totalitat del volum s'ha de carregar al pouet, o sinó, la quantitat de proteïna afegida serà inferior a la calculada.

- Les mostres preparades s'escalfen a 95°C durant 5 minuts.

- Mentre bullen, els gels es col·loquen a l'interior de la cubeta d'electroforesi, i es prepara 0,5 L de tampó d'electroforesi per cada cubeta de dos gels (diluïnt 10 cops el

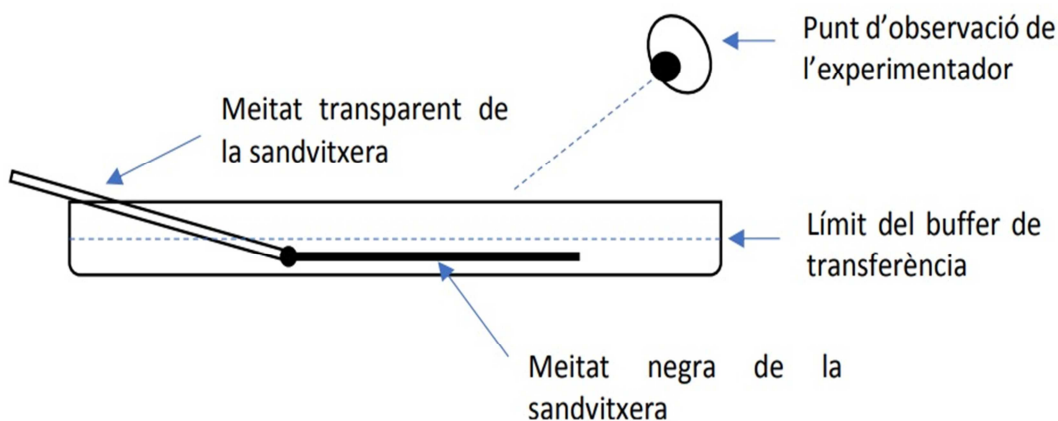
concentrat amb aigua destil·lada). La cubeta s'omple amb el tampó, primer entre els gels, i quan s'arribi a dalt de tot, per l'exterior.

- Es retiren les pintes i els pouets generats es netegen amb el mateix tampó d'electroforesi (amb una pipeta automàtica es tira tampó al pouet amb certa força).
- Una vegada bullides les mostres, aquestes es carreguen en el gel (el volum que toqui i en l'ordre que toqui- **es recomana mirar els gels des del vidre gran i començar a carregar des de l'esquerra**) i en el primer i últim pou de cada gel, com a mínim, es carreguen 10 µL de solució de marcadors de pes molecular.
- Si s'ha de carregar més d'una cubeta d'electroforesi amb mostres, mentre s'acaba de carregar la segona, la primera es pot connectar a la font d'alimentació a una potència fixa de 20 mA, evitant així la difusió de les mostres pel gel. I quan s'acaben de carregar tots els gels, les cubetes es connecten a les fonts a una intensitat fixa de 30 mA per cada gel (tenint en compte que en cada cubeta hi caben fins a 2 gels), i es deixen córrer les mostres entre 1,5 i 2 h (fins que el blau de bromofenol arribi a baix de tot i surti del vidres).
- Una vegada acabat el procés, el buffer d'electroforesi es descarta.

### **Transferència de proteïnes del gel de poliacrilamida a la membrana PVDF**

- Abans de començar a fer la transferència, es retalla una membrana de PVDF 8,5 cm x 5,5 cm i 4 papers Whatman 9 cm x 6 cm per cada gel a transferir. Les membranes es marquen amb la data i el número de gel (en el cas de tenir-ne més d'un) a la part inferior dreta, amb llapis, sinó el metanol després s'emporta el marcatge. Aquesta marca és important, donat que al llarg de tot aquest protocol, un aspecte molt important a tenir en compte és la direccionalitat de les membranes.
- També cal preparar 800 mL de tampó de transferència per cada cubeta electroforètica, mesclant 80 mL de la solució concentrada 10x amb un 20% de metanol (160 mL) i la resta d'aigua destil·lada (560 mL).
- Una vegada acabats els dos anteriors punts, ara només falta muntar l'aparell de transferència:

1. Es pren una cubeta gran i plana i s'omple amb part del tampó de transferència acabat de preparar fins assolir una profunditat d'aproximadament 2 cm.
2. També es prepara una cubeta més petita i plana plena de metanol just al costat de l'anterior, per a tenir-la accessible sobre la taula de treball.
3. Es pren cadascuna de les "sandvitxeres" de les dues que consta l'aparell de transferència i s'obren, repetint els passos que explicaré a continuació per cadascun dels gels (1 gel/sandvitxera).



**Figura 2A.** Esquema mostrant la posició de la sandvitxera en la preparació de la transferència i col·locació correcta dels gels i membranes. Elaboració pròpia

4. Al obrir-les, aquestes presenten dues meitats, una negra i una transparent; cal posar la part negra submergida en la cubeta amb buffer de transferència preparada anteriorment, tal com s'indica a la Fig. A2. És important fer aquesta distinció perquè el color marca la direcció en que es transferiran les proteïnes, sent el negre el futur pol negatiu (càtode) del que s'allunyan, i el transparent el futur positiu (ànode), cap on seran atretes.

5. Ara, es pren una de les dues esponges que venien incloses dins la sandvitxera, s'humiteja en el mateix buffer de transferència de la cubeta i es col·loca centrada sobre la meitat negra. Sobre aquesta, es posen també centrats dos papers Whatman retallats anteriorment, també humitejats en el buffer.

6. A continuació s'obren els vidres que contenen el gel d'electroforesi amb l'ajuda d'unes pinces, i fent servir un dels dos vidres o qualsevol altre peça adequada, es talla el gel concentrador, i es descarta, dipositant el gel separador sobre els papers Whatman anteriors, col·locant el carril que considerem el número 1 a la nostra esquerra i la part inferior del gel (cap on han corregut les proteïnes en l'electroforesi) cap a nosaltres (fixar-se en el punt d'observació en l'esquema de la Fig. A2, procurant que no quedin bombolles sota el gel. Posar el gel d'aquesta forma permetrà localitzar després quins carrils són quins, sabent exactament on veure cada mostra.

7. Amb les pinces, ara prenem les membranes PVDF tallades i marcades amb llapis (important no tocar-les amb les mans sobretot si no es porten guants) i s'humitegen 5-10 segons en el metanol de la cubeta preparada, cosa que permet activar-les, i a continuació es torna a mullar amb el buffer de transferència per equilibrar-la. En aquest punt, es col·loca la membrana sobre el gel, posant la cara

escrita en llapis direccionada cap al mateix gel, amb la data que hem escrit cap a l'esquerra, és a dir, cap al carril 1. Per tant, aquí ja veiem que les proteïnes del carril 1 quedaran al mateix costat que la data que hem apuntat, ajudant a direccionar totes les mostres. És extremadament important en aquest pas, de la mateixa manera que en l'anterior, que no quedin bombolles entre el gel i la membrana, perquè això evitaria que es poguessin transferir correctament les proteïnes. Aquí ens podem ajudar d'un Falcon de 15 mL buit, que ens permeti humitejar contínuament la membrana i aplanar-la, empenyent les bombolles cap a fora de la zona de transferència.

8. Sobre aquesta, s'afegeixen els dos papers Whatman que cal humitejar també en buffer de transferència, i sobre ells, es posa l'altra esponja, també humida, i evitant com sempre la formació de bombolles.

9. Ara només cal tancar la sandvitxera, i si tenim més gels, cal repetir el procés des del punt 3 fins aquí per cada gel. Cadascuna d'aquestes s'encabeix en el seu suport, posant el costat negre de la sandvitxera cap al costat negre del suport, i el transparent cap al vermell.

10. El suport ara es col·loca en la cubeta electroforètica (la mateixa que s'ha fet servir per a l'electroforesi), juntament amb un bloc de gel per a evitar l'escalfament excessiu per l'efecte Joule (el mateix pack de transferència inclou un recipient blanc de plàstic que cal omplir d'aigua destil·lada i congelar prèviament).

11. Finalment, s'acaba d'omplir la resta de la cubeta amb el buffer de transferència (aprox. 800 mL) que hem fet servir al llarg de tot el protocol.

12. La cubeta es tapa i es connecta a una font d'alimentació, a una intensitat fixa de 250 mA durant 1h. **NOTA:** aquí fa falta 1 font/cubeta electroforètica, perquè sinó, la font no té prou intensitat i aquesta es reparteix entre les diferents cubetes connectades, resultant insuficient.

- Tot el material, tant el fet servir en l'electroforesi com en la transferència es pot rentar amb aigua de l'aixeta primer i després destil·lada i es deixa assecar. El metanol usat es guarda per a fer-lo servir més cops, i el buffer de transferència, a diferència del d'electroforesi que es llença, es recicla per a futurs usos.

#### Immunodetecció de proteïnes específiques sobre membranes PVDF

- Una vegada acabada la transferència, es recuperen les membranes PVDF i es procedeix a bloquejar-les: cal treure-les ràpidament de l'aparell de transferència per a

evitar que s'assequin i es posen en una cubeta petita que contingui 25 mL de solució de bloqueig (com ja he comentat en l'apartat de reactius i materials, és una solució de llet en pols 5% p/v en PBS-tween 0,1%). S'admeten fins a 2 membranes per cubeta. Les membranes es deixen incubant en agitació a T ambient duran 1h.

- Un cop acabat el bloqueig, cal procedir amb 3 rentats de 10 min amb PBS-tween de les membranes (posar PBS-tween en la cubeta i deixar en agitació 10 minuts). Aquest rentat es pot suprimir si l'anticòs primari que es farà servir a continuació està dissolt en solució de llet en pols 5% p/v en PBS-tween, si per contra està dissolt només en PBS-tween, és necessari fer-lo.

- A continuació cal preparar les solucions d'anticòs primari, és a dir, les solucions que contindran l'anticòs que s'unirà específicament a cadascuna de les proteïnes a localitzar sobre la membrana. La dilució que s'aplica en cada cas (que poden anar des de 1/500 fins 1/5.000) i el solvent utilitzat (PBS-tween o llet en pols en PBS-tween) depèn de la proteïna a localitzar i de les recomanacions del fabricant de l'anticòs. A més, també s'intenta, sempre que sigui possible, que tots els anticòsos primaris usats en el western siguin fets en un mateix animal, per exemple en ratolí, per a que totes les membranes es puguin incubar després en la mateixa solució d'anticòs secundari (que com sabem, reconeix la cua de l'anticòs primari fet en una certa espècie).

- Ara es prenen les membranes PVDF i s'incuben O/N en agitació i en fred (4°C) en la solució d'anticòs primari. Alternativament, es pot fer una incubació de 2h a T ambient. Si l'anticòs primari utilitzat és només un, amb el que he explicat en aquest punt ja seria suficient, però normalment, en un western volem localitzar més d'una proteïna a la vegada, i per tant, el que cal fer és retallar les membranes PVDF amb tisores usant com a referència les bandes dels marcadors de pes molecular, que indiquen les regions aproximades on poden estar les proteïnes d'interès. Cada regió aleshores és incubada per separat amb l'anticòs primari adient per a marcar la proteïna sobre la membrana. Com les membranes queden tallades en fragments petits, aquests poden ser incubats inclús en falcons de 15 mL amb les solucions d'anticòs. **NOTA:** en aquest cas s'està descrivint un sistema indirecte en el que primer es marca la proteïna amb un anticòs primari i després es fa servir un de secundari que reconeix la cua del primari i que està marcat amb algun element que senyalitza la presència de la proteïna. Alternativament es pot fer servir el sistema directe en que l'anticòs primari està marcat ja amb el sistema de detecció i no cal la presència de secundari per a revelar el resultat.

- L'endemà (o al cap de dues hores), es recuperen les membranes i es fan 3 rentats de 10 minuts en PBS-tween (en agitació).

- Les solucions d'anticòs primari es recuperen i reciclen per usos posteriors, guardant-les a -20°C. I ara es poden preparar les d'anticòs secundari: normalment és anticòs anti-mouse o anti-rabbit (segons en quina espècie s'hagi fet el primari), dissolt 1/10.000 en PBS-tween, i conjugats a HRP, un enzim que permetrà marcar la presència



de la proteïna perquè en contacte amb el substrat adequat, produeix quimioluminiscència que queda marcada en films fotogràfics. Aquí es posa l'exemple d'aquest enzim però hi ha molts altres sistemes enzimàtics que funcionen de forma semblant i d'altres no enzimàtics.

- Les membranes s'incuben 1 h en agitació amb la solució d'anticòs secundari a T ambient, i després la solució es descarta.

- Es realitzen 3 rentats de 10 minuts amb PBS-tween.

- Ara ja es pot procedir al revelat: es recuperen les membranes (ràpid per evitar que s'assequin) i es col·loquen en ordre els trossos en que s'hagin tallat sobre una superfície plana i impermeable (el més adequat seria posar-les en una cubeta prou ample per a contenir-les). Una vegada reconstituïdes, es posen en contacte amb el reactiu de revelatge *Luminata<sup>TM</sup> Classico Western HRP Substrate*, normalment posant-ne prou sobre les membranes per a que cobreixi tota la superfície, durant 1 minut.

- En un cassette de revelat de westerns, ara es posa un plàstic protector de doble capa, unit al cassette per una tira de celo, i entre les dues capes s'afegeixen els trossos de membranes en l'ordre d'interès **i amb la marca en llapis cap amunt, sabent que el carril 1 quedarà a la dreta**, traient també d'entre els plàstics qualsevol bombolla que pugui quedar usant paper de filtre.

- El cassette es tanca i es va a una sala de revelat d'immediat, portant amb nosaltres a més del cassette, un cronòmetre, unes tisores i els films fotogràfics, sempre protegits de la llum.

- Dins la sala de revelat, només es poden treure els films del paquet sota llum vermella, ja que la blanca els faria malbé. I en aquestes condicions, es prenen els films, i per a saber quin carril és quin en el revelat final, es talla una de les cantonades. A continuació es posa el film dins el cassette i es tanca un temps determinat, i immediatament després s'introdueix en el revelador automàtic. Normalment, primer es fan servir dos films simultàniament i es posen dins el cassette durant 5 segons, per a tenir una senyal poc marcada de les proteïnes house-keeping expressades en gran quantitat (com tubulina o actina), i després es fan servir films d'un en un, a temps d'exposició progressivament més grans: 30 segons, 1 minut, 2 minuts,... segons les proteïnes que vulguem observar. Cal tenir en compte que quan més baixa sigui la quantitat de proteïna, més temps d'exposició farà falta per a detectar-la en els films.

- Una vegada acabats els revelats, i ja en una habitació ben il·luminada, es marquen en els films les bandes del marcador de pes molecular (fent servir com a plantilla les mateixes membranes PVDF del cassette), fet que ens permetrà saber a quina proteïna correspon cadascuna de les marques en el film, segons el pes molecular.

#### A4.4 Stripping

##### *Reactius i Material*

- Noves dilucions dels anticossos d'interès
- Membranes PVDF de westerns anteriors
- Llet en pols
- PBS-tween 0,1%

##### *Mètode*

Aquest protocol es porta a terme en aquells casos en que la membrana PVDF d'un western no adhereix correctament els anticossos, en la que no hem vist prou bé els resultats en el revelatge, o en el cas de voler veure dues proteïnes de pes molecular molt semblant. En tal situació, aquest procediment permet desadherir els anticossos antics de la membrana i re-incubar-la amb noves dilucions, per a comprovar si, al canviar l'anticòs, el resultat millora (nova o millor visibilitat de les bandes, major intensitat, o simplement presència de marcatge, en el cas de que els anteriors anticossos no hagin funcionat en absolut):

- Es preparen les noves dilucions d'anticossos, tant primaris (normalment dilució 1/1.000) com secundaris (normalment dilució 1/10.000), en PBS-tween o en solució de 5% (p/v) de llet en PBS-tween, depenent del que recomani el fabricant. A més, també es prepara 25 mL/cubeta d'incubació d'una solució de bloqueig al 5% de llet en pols (1,25 g de llet en pols en 25 mL de PBS-tween), que de fet és igual que la solució que es prepara per a diluir els anticossos en solució de llet.
- Es fan 3 rentats de 10 min en agitació amb aigua destil·lada bullint de les membranes de PVDF antigues, per a desadherir els anticossos antics.
- S'incuben les PVDF 30 minuts en agitació amb la solució de bloqueig.
- Es fan 3 rentats de 10 min en agitació amb PBS-tween (NOTA: aquest rentat només és necessari en el cas de que els anticossos a aplicar a continuació estiguin dissolts en PBS-tween, si ho estan en llet, no cal fer-lo).
- S'incuben les membranes amb els anticossos primaris O/N a 4°C en agitació, o alternativament, 2h a T ambient en agitació.
- Es fan 3 rentats de 10 min en agitació amb PBS-tween.
- S'incuben les membranes amb els anticossos secundaris 1h en agitació.
- Es fan 3 rentats de 10 min en agitació amb PBS-tween.

Es revela seguint el protocol explicat en l'apartat A4.3 .

### **A.5 Assaig de consum d'oxigen d'un cultiu cel·lular (XF24 Extracellular Flux Assay, Seahorse)**

Tal com s'ha esmentat en la introducció, l'assaig que permet portar a terme aquest aparell mesura el consum d'oxigen del cultiu cel·lular, i per tant avalua la seva funció respiratòria. Aquest és doncs un assaig que ens permet acabar la valoració de la funcionalitat mitocondrial completament.

#### *Reactius i Materials*

- Medi DMEM 25 mM Glc (cat n° 41966-029 Gibco), 10% FBS, Hepes 25 mM, Penicil·lina/estreptomicina 1%. Preparat a partir de 500 mL DMEM + 50 mL FBS +10 mL Hepes 1,25 M + 5 mL P/S.
- Medi DMEM 5,5 mM Glc, Penicil·lina/estreptomicina 1%, Piruvat de sodi 1 mM, Glutamina 2 mM i sense tampó de pH
- Tampó equilibrador inclòs en l'equipament del XF24 Extracellular Flux Analyzer: XF Calibrant (pH 7,4)
- Plaques de 24 pouets específiques de l'aparell (es compren a la mateixa casa comercial)
- Pipetes serològiques estèrils
- Falcons de 15 mL estèrils
- Pipetes Pasteur de vidre (per a utilitzar la bomba de buit)
- Tripsina: Gibco trypsin-EDTA (0,05%), Phenol red
- PBS
- XF24 Extracellular Flux Analyzer
- Incubadors a 37°C en presència (5%) i absència de CO<sub>2</sub>
- Solució d'Oligomicina
- Solució de CCCP
- Solució d'Antimicina
- Solució de Rotenona
- Tampó de lisi total (NaOH 0,1 N i SDS 0,1% v/v)

## Mètode

- Es comença sembrant les cèl·lules que es vulguin avaluar en les plaques específiques de l'analitzador, fent servir el protocol explicat a l'apartat A1.3. Si és menester, les cèl·lules s'incuben amb un compost o no, depenent de l'experiment a realitzar. Es deixen creixent en l'incubador a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> fins el moment de l'experiment.

- El dia anterior a realitzar la lectura, cal equilibrar la tapa de la placa, donat que és la que conté les sondes que mesuraran el consum d'oxigen. A la Fig. A10 es pot veure l'esquema d'una regió de la tapa, que es repeteix per cadascun dels pouets: aquesta conté la sonda en el centre i quatre canals d'injecció, que es faran servir per a afegir inhibidors de certs complexos mitocondrials en el

medi durant la mesura. L'equilibració s'aconsegueix deixant la tapa en contacte amb una placa clònica a la que s'ha fet servir per a sembrar les cèl·lules, que contingui en cada pouet també equilibrador (que estigui ple), durant tota la nit en un incubador a 37°C i sense CO<sub>2</sub> (d'aquesta manera s'evita el seu efecte sobre la modulació del pH: important pensant que l'aparell també es pot programar per a mesurar el canvi de pH i així registrar una possible producció de lactat).

- Arribat el dia de la lectura, primer es canvia el medi de les cèl·lules per un medi DMEM amb una concentració inferior a la usual de Glucosa (5,5 mM), que obligarà a les cèl·lules a fer servir un metabolisme oxidatiu, sense tampó Hepes, perquè com a part de l'experiment també es poden mesurar els canvis de pH com hem explicat, i amb el pH ajustat a 7,4, a més de piruvat, glutamina i antibiòtics en les concentracions indicades en l'apartat de reactius i materials. El volum de medi a preparar ha de ser suficient per a afegir 700 µL a cada pouet, i per a diluir els inhibidors, tenint en compte que en cada canal d'injecció hi van 75 µL, i la placa té 24 pouets, i cada pouet 4 canals. És a dir, per a una placa plena, farien falta al voltant de 25 mL de medi per a fer l'assaig.

- La placa amb les cèl·lules es deixa en l'incubador a 37°C i sense CO<sub>2</sub> durant 1 h.

- En aquest moment, es recupera la tapa de la placa que s'ha incubat sense CO<sub>2</sub> O/N i es carreguen els canals amb els inhibidors (fixar-se en Fig. A10), dissolts en el medi acabat de preparar, de la següent forma:

A = 75 µL d'Oligomicina 12,5 µM

B = 75 µL de CCCP 10 µM

C = 75 µL de CCCP 5 µM

D = 75 µL de solució d'Antimicina 1 µM i Rotenona 1 µM

- Aquestes concentracions ja s'han definit per a cèl·lules MEF específicament i 10x, tenint en compte que en quan l'inhibidor s'afegeixi als 700 µL del pouet, estarà aproximadament a la concentració de treball.

- A continuació es pren la tapa i la placa amb tampó d'equilibració, i es posa en el *XF24 Extracellular Flux Analyzer* durant 30min-1h (depèn del nombre de pouets plens), per a calibrar l'aparell.
- Acabada la calibració, es canvia la placa amb tampó per la que conté les cèl·lules: es retira aquesta última de l'incubador sense CO<sub>2</sub>, se li posa la tapa amb els inhibidors que teníem dins l'analitzador, i es procedeix a la mesura amb l'aparell.
- L'analitzador mesurarà el consum d'oxigen inicial, i en presència de l'inhibidor A, del B, del C i del D, donant els resultats en *Oxygen Consumption Rate* (**OCR** o la mesura de la quantitat d'oxigen que es consumeix) i *Extracellular Acidification Rate* si s'escau (**ECAR** o mesura del pH en el desenvolupament de l'experiment).
- Finalment, i després d'acabar les mesures de l'aparell, les cèl·lules de cada pouet es lisen amb 100 µL de tampó de lisi total (composició en els materials d'aquest apartat). A continuació, de cada pouet, es prenen 10 µL i se'n mesura la concentració proteica, seguint el protocol de la quantificació d'extractes cel·lulars amb BCA (apartat A5.2). Aquest últim pas permet normalitzar les dades en funció de la quantitat de proteïna en cada pouet, que com ja s'ha dit, és un valor indicatiu de la quantitat de cèl·lules que hi havia en cada mostra mesurada (en aquest cas, cada pouet mesurat).

