

## Maridaje en la célula

Alejandro Martorell Riera

### Introducción

El amor es una especie de deseo, de atracción entre dos seres. Es una atracción de efecto y apego acompañado de muchos sentimientos donde se expresan emociones, actitudes y experiencias que, cómo explosiones en la noche, se funden en una misma respuesta. Según Platón, el amor es el fundamental empuje hacia la filosofía. Lo que viene a decir que sin amor ni comprensión entre dos o más, los razonamientos lógicos y coherentes no encuentran receptor.

Desde un punto de vista común, el amor genera placer. Este placer se transforma en una sintonía simétrica y perfecta, en un maridaje. Igual que en gastronomía las buenas comidas son acompañadas de buenos vinos escogidos por el sumiller según el tipo de alimentos que se vayan a degustar y la hora del día en la que se encuentren; en el interior de las células se siguen unas reglas muy similares, puesto que hay armonías y comunicaciones entre orgánulos perfectamente reguladas a nivel molecular.

La visión de la célula rellena de objetos (orgánulos) estáticos y separados entre ellos, como si de personas enemistadas y sin relación se tratara, es totalmente falso. En la última década se ha observado que muchos de los componentes celulares están en continua interacción y que el buen funcionamiento de esta puede llegar a diferenciar entre la supervivencia de la célula o la muerte.

En este artículo vamos a dar un paseo romántico por una de las relaciones que más controversia y emociones está despertando actualmente en la comunidad científica. Vamos a hablar del retículo endoplasmático (RE) y las mitocondrias. Las mitocondrias son los generadores de energía de la célula, además, de las múltiples reacciones metabólicas que se desarrollan en su interior y gracias a ellas y su implicación dinámica en tantos procesos imprescindibles para la célula. El retículo endoplasmático cumple muchas funciones básicas para la célula como la síntesis de proteínas y la distribución de enzimas y otras moléculas por el interior de la célula y hacia su exterior, además de ser depósitos de calcio.

Por lo visto, los puntos de contacto entre ambos ayudan enormemente a la estabilización de cada uno de ellos y a mantener el buen funcionamiento de muchos procesos celulares tan comunes como la regulación del calcio y el control de la muerte celular programada. En muchas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, las neuronas afectadas podrían tener problemas graves justo en estos puntos de comunicación entre ambos orgánulos. Aquí radica la importancia de su estudio y su comprensión.

El **Dr. Antonio Zorzano** (profesor del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona) es el investigador principal de un grupo de investigación ubicado en el Instituto de Investigación Biomédica (IRB) de Barcelona, cuyo objetivo es determinar los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina y, más concretamente, identificar nuevos genes de susceptibilidad a la obesidad y la diabetes. En los últimos trabajos publicados en revistas de alto impacto científico han centrado los esfuerzos en explicar los mecanismos moleculares activados en condiciones en las cuales la fusión y fisión mitocondrial son alteradas. Gracias a estas investigaciones han logrado establecer la asociación entre el estrés de retículo endoplasmático y la dinámica mitocondrial. Estos trabajos han abierto una nueva perspectiva para el estudio de la comunicación entre orgánulos y la señalización celular.

### **Breve historia**

La intuición de la existencia de una posible conexión física entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias se empezó a mencionar hace muchas décadas y las primeras observaciones las podemos situar en los trabajos desarrollados por el científico americano John Ruby. Con la ayuda de los avances en microscopía electrónica, en 1969 se aventuró a anunciar la posible interacción entre ambos orgánulos. Sin embargo, la zona de las membranas del RE y las mitocondrias que entran en contacto, o también conocido como MAM (*Mitochondrial Associated Membranes*, en inglés), no se descubrió como una entidad bioquímica hasta 1990. Para llegar a esta conclusión hace más de 20 años, se tuvieron que llevar a cabo técnicas, a día de hoy muy utilizadas, como la isolación de membranas mediante fraccionamiento celular, es decir, aislar mediante técnicas de separación distintos tipos de orgánulos o fragmentos de membrana según sus propiedades bioquímicas.

La mejor forma de definir las zonas MAM es describiéndolas como la representación de las membranas de RE que se encuentran estrechamente yuxtapuestas a las de las mitocondrias, es decir, dos membranas distintas de orgánulos diferentes pero que pueden purificarse juntas según la técnica descrita con anterioridad. En 1998 se llevó a cabo un gran avance en la caracterización de las MAM. Se mostró que las mitocondrias se encontraban ante una mayor concentración de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), en comparación con el citoplasma de la célula, después de que el RE liberase el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado. Estos resultados sugirieron la existencia de zonas o micro dominios ricos en calcio entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias que requiere una unión proteica y física entre ambos orgánulos.

Más adelante se han ido definiendo otras funciones a las MAM como es la homeóstasis de lípidos (1998) y la propia síntesis de los lípidos (1999), indicando las funciones que se han conservado y han evolucionado en los sitios de unión del RE y las mitocondrias. En la última década, a través de los continuos avances en las técnicas de formación de imágenes de células vivas que permiten reconstrucciones en 3D de las redes de RE y de las mitocondrias y los sofisticados estudios de tomografía de electrones, la superficie total de las mitocondrias yuxtapuesta al RE se ha estimado en alrededor del 5 al 20 % del total. También se ha

comprendido que las MAM no son simples uniones entre estos orgánulos si no que permiten el tránsito de moléculas y activación de cascadas de señalización importantes para la célula.

Actualmente, las funciones que se atribuyen a las MAM son las siguientes:

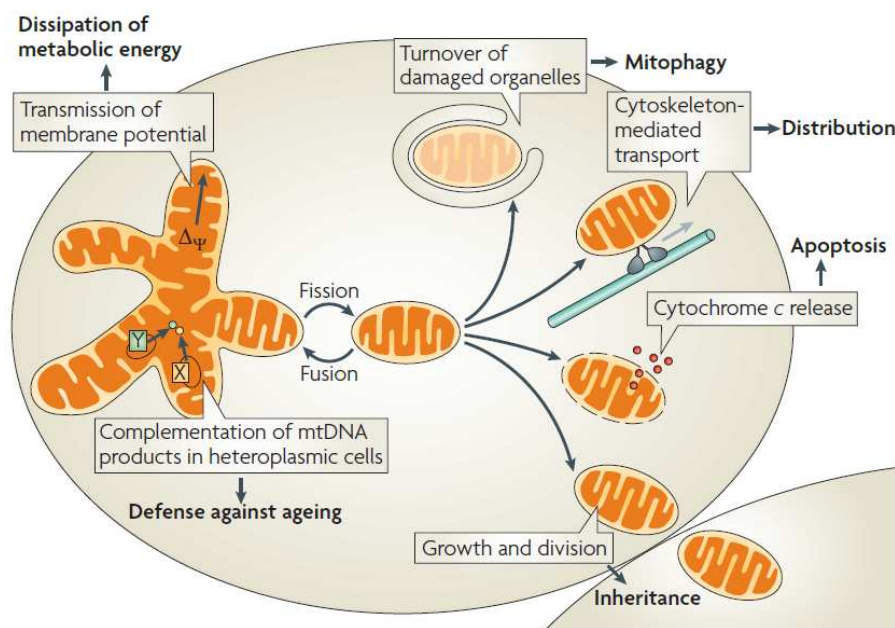
- Control de la morfología mitocondrial.
- Posible activación de las cascadas de muerte celular programa o apoptosis.
- Síntesis de lípidos.
- Señales de control de la autofagia.
- Transporte de calcio.
- Amplificación de señales de inflamación.
- Unión entre el RE y las mitocondrias.
- Respuestas antivirales.

## Papel del retículo endoplasmático en la fisión mitocondrial

Es importante comprender que las mitocondrias son orgánulos de la célula que no están conectados al sistema de transporte vesicular que engloba otros orgánulos. A pesar de ello, el contacto físico o la comunicación vía intermediarios entre las mitocondrias y otros orgánulos es más que palpable. De hecho, se ha calculado en levaduras hay alrededor de 100 contactos entre el RE y las mitocondrias y que alrededor del 5-20% de la superficie de las mitocondrias de células humanas está en íntima proximidad con el retículo endoplasmático.

Las mitocondrias son unos de los orgánulos de la célula más dinámicos. Continuamente están dividiéndose y fusionándose, cambiando su tamaño y distribución. El auge en la investigación de la dinámica mitocondrial ha ganado mucha más atención en los últimos 20 años cuando se ha visto lo importante que es para la comprensión de muchos procesos biológicos como el mantenimiento de las funciones mitocondriales, la apoptosis y el envejecimiento. Son muchos los genes que se han identificado relacionados con la fusión y fisión en levaduras y células de mamíferos, siendo el primero de ellos en 1997 en *Drosophila melanogaster*, una especie de mosca utilizada mucho como modelo animal para investigar.

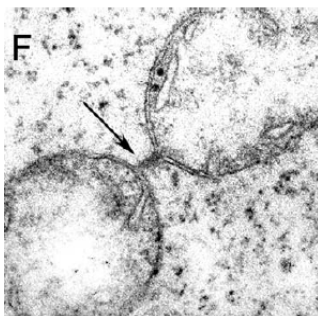
La mayoría de los orgánulos de la célula pueden generarse de nuevo a excepción del retículo endoplasmático y las mitocondrias que deben proliferar por el crecimiento y la división de los orgánulos pre-existentes. Tal como se esquematiza en la **Figura 4**, la fusión entre mitocondrias promueve el intercambio de contenido entre una y otra. Este proceso es muy importante para disipar la energía generada por un incremento del potencial de membrana mitocondrial, para intentar paliar la acumulación de mutaciones en el mtDNA y para disminuir o diluir algún aumento repentino de radicales libres de oxígeno (ROS).



**Figura 1.** Funciones biológicas de la dinámica mitocondrial (Westermann B, 2010).

De forma antagónica, la fisión mitocondrial promueve la división de un orgánulo generando dos nuevos (**Figura 4**). Este proceso permite a la célula distribuir y reorganizar su compleja red de mitocondrias para adaptarla a las necesidades que van variando. Durante la división celular, los orgánulos se fisian para generar mitocondrias más pequeñas que pueden ser más fácilmente repartidas entre las dos células hijas. Durante la distribución de las mitocondrias por todo el interior de la célula, cabe resaltar que unos orgánulos más pequeños pueden ser más fácilmente repartidos y enviados a los puntos donde se requiere su función. La correcta regulación de la distribución mitocondrial es vital en tipos celulares grandes o largos como las neuronas que presentan un árbol dendrítico de importante tamaño y un axón largo para hacer las sinapsis. Un acontecimiento clave en la apoptosis es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial que libera el citocromo c y otros factores pro-apoptóticos desde el espacio intermembrana al citosol para desencadenar la apoptosis. La apoptosis y su link con la fisión mitocondrial se describió en mamíferos por primera vez en 2001 y se vio que el proceso es mediado por un evento previo de semi-fisión que involucra la proteína Drp1, la principal encargada de la fisión mitocondrial. La autofagia de las mitocondrias se denomina mitofagia. Es tentador especular que la mitofagia constituye un mecanismo para eliminar las mitocondrias disfuncionales de la célula y por lo tanto prevenir la proliferación de mtDNA mutado. Es este proceso, la fisión de las mitocondrias es vital para poder crear orgánulos más pequeñas y ser eliminados por autofagia de forma más sencilla.

La división de las células bacterianas depende de una proteína conocida como FtsZ una proteína que se auto-ensambla en una estructura de anillo asociada a la membrana plasmática que coordina el montaje de toda la maquinaria de división. Se ha descrito que en algunas algas primitivas esta maquinaria se ha conservado a partir de las proteínas de los antepasados bacterianos para fisianar las mitocondrias del alga. Sin embargo, durante la evolución de la mayoría de los linajes eucariotas, la maquinaria de división procariota se sustituye por otro tipo de proteínas. En contraste con la maquinaria de división bacteriana, que actúa sobre el lado interno de la membrana plasmática, la maquinaria de división mitocondrial se ensambla en el exterior del orgánulo. En animales superiores la proteína implicada en la fisión mitocondrial es la llamada Drp1. Esta proteína se ubica en su gran mayoría en el citoplasma de la célula y es reclutada a través del receptor MFF a la membrana de las mitocondrias. En la **Figura 2** se muestra un ejemplo de fisión mitocondrial en células animales.



En animales superiores la proteína implicada en la fisión mitocondrial es la llamada Drp1. Esta proteína se ubica en su gran mayoría en el citoplasma de la célula y es reclutada a través del receptor MFF a la membrana de las mitocondrias. En la **Figura 2** se muestra un ejemplo de fisión mitocondrial en células animales.

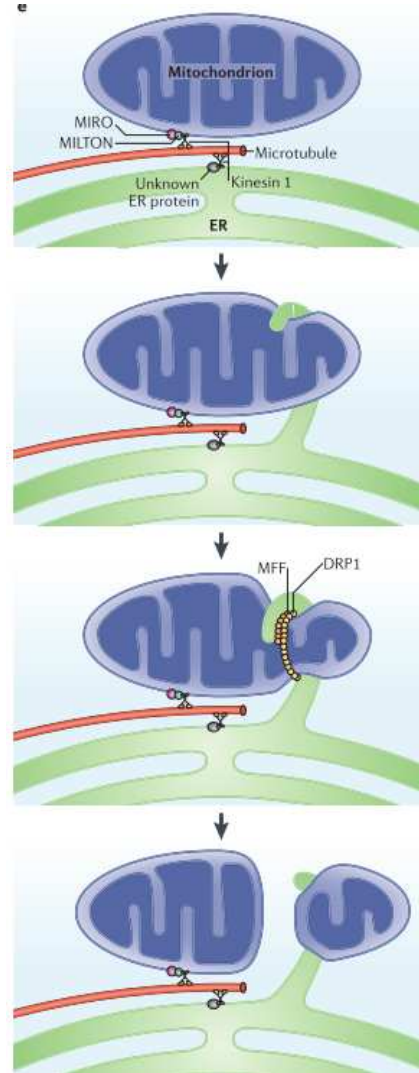
**Figura 2.** Anillo de división mitocondrial observado con microscopia electrónica (Kuroiwa T, et al. 2006).

Cuando las proteínas Drp1 se asocian para constreñir la mitocondria, consiguen alcanzar un diámetro de alrededor de 100 nm. Este tamaño no es suficiente ya que las mitocondrias tienen, de media, 300 nm de espesor. Estas observaciones dieron a pensar que otro mecanismo, todavía no descrito, debería ser el causante de constreñir las mitocondrias permitiendo el ensamblaje de Drp1 y, por lo tanto, el propio proceso de fisión. Estos pensamientos también se asociaron a otros donde se planteaba cómo se seleccionan los sitios o puntos de fisión de las mitocondrias porque estos orgánulos no se dividen por el centro, si no

todo lo contrario, es un proceso que ocurre en cualquier punto localizado en todo lo largo de la mitocondria. Ensayos de tomografía electrónica (una técnica que brinda la posibilidad de determinar estructuras tridimensionales de material biológico a niveles de resolución suficientemente altos como para permitir la identificación de macromoléculas individuales tales como proteínas) y microscopía de fluorescencia de células vivas de levadura y células de mamíferos reveló que el RE se envuelve alrededor de las mitocondrias antes de que Drp1 sea reclutada. Esta actividad del RE marca los sitios de fisión y, posiblemente, asiste al montaje del anillo de división de Drp1 para la constricción del orgánulo (**Figura 3**). Este proceso, que se podría denominar también división RE-mitocondria asociada, se conserva desde las levaduras hasta los mamíferos.

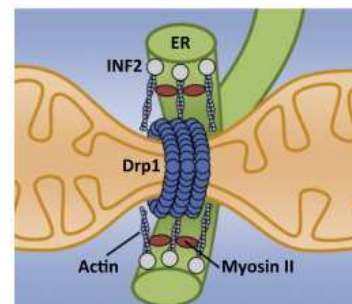
Curiosamente, cabe remarcar que algunos estudios también han revelado que la constricción mitocondrial llevada a cabo por el retículo endoplasmático puede ocurrir en la ausencia de Drp1 y MFF, lo que sugiere que la selección de los puntos de fisión por parte del RE se produce antes del montaje de la maquinaria de fisión encabezada por la propia Drp1.

**Figura 3.** Representación esquemática sobre el sistema de fisión mitocondrial promovido por el retículo endoplasmático (Rowland AA and Voeltz GK, 2012).



También se ha observado que el citoesqueleto de actina contribuye a este proceso, por lo menos en las células de mamíferos. En este caso cabe recalcar el papel de la proteína INF2 que acelera la polimerización (formación) y despolimerización (destrucción) de la actina. En este contexto, INF2 se ubica en el RE y activa la formación de la actina en dirección a la mitocondria a la cual se esté rodeando. Es posible que el crecimiento de la actina ayude a constreñir más a la mitocondria. Otra proteína implicada es la miosina II, una proteína contráctil que podría estar ayudando a la actina en sus funciones. Ambas proteínas, INF2 y miosina II, parecen tener una clara implicación en la generación de fuerza para conducir la fisión mitocondrial y el reclutamiento de Drp1 (**Figura 4**).

**Figura 4.** En mamíferos, la proteína INF2 asociada a RE podría estar contribuyendo a la fisión mitocondrial promoviendo la formación de filamentos de actina. La miosina II podría generar, entonces, la fuerza de soporte necesaria para poder facilitar la acción de Drp1 tras ser reclutada (Kleckler T, et al. 2014).



## La relevancia de las MAM en las principales enfermedades neurodegenerativas

Actualmente la comunidad científica dedicada concretamente al estudio de las enfermedades neurodegenerativas está viviendo un continuo debate en torno a las causas de dichas patologías. Desde hace muchos años se conoce que cada una de las enfermedades crónicas de nuestro sistema nervioso central está asociada a la acumulación descontrolada de alguna proteína que promueve un mal funcionamiento, no solamente de las neuronas, sino también del tejido cerebral en general. En la enfermedad de Alzheimer la proteína causante es el péptido  $\beta$ -amiloide, en Parkinson es la  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) y en Huntington es la huntingtina (htt). La característica principal es que todas ellas terminan acumulándose, por distintos motivos, conllevando a la subsecuente muerte de las neuronas y el tejido colindante. Los científicos llevan mucho tiempo estudiando el porqué de la acumulación de estas proteínas, en cómo afectan en los modelos animales que se utilizan para simular estas enfermedades y en buscar posibles terapias. El debate actual se centra en que la acumulación de estas proteínas podría no ser la causa de las susodichas enfermedades, sino una mera consecuencia.

¿Una consecuencia de qué?, ¿dónde residiría la causa? Para responder estas preguntas es necesario centrarse en las mitocondrias y, concretamente, en las zonas MAM. La participación de las mitocondrias y el papel que juegan en muchas enfermedades está quedando cada vez más ligado. Hasta hace algunos años los investigadores no centraban sus miras y sus esfuerzos en estos orgánulos con el objetivo de comprender o solventar patologías. Pero los avances en los últimos años han demostrado un importante vínculo en el mal estar de las mitocondrias y su relación con las enfermedades neurodegenerativas, en este caso.

Es importante comprender que las MAM son zonas de membrana especializadas para llevar a cabo las funciones que acarrean. Una de las principales características a nivel bioquímico es que las zonas de membrana de la mitocondria yuxtapuestas al RE son ricas en cardiolipina. Este fosfolípido otorga cierta rigidez a la membrana actuando como hace el colesterol en las balsas lipídicas o lípidos *Raft* de la membrana plasmática de la célula. Esta rigidez permite la acumulación de proteínas específicas que son requeridas en esta zona.

La enfermedad de **Alzheimer** es la primera causa de demencia en personas de todo el mundo. Comienza con una suave y lenta progresión de pérdida de la memoria y luego con un continuo de síntomas debilitantes, como la pérdida completa de las capacidades cognitivas y las funciones corporales, en última instancia conduce a la muerte. Aunque los casos de Alzheimer son en su mayoría esporádicos, en general, los primeros síntomas no aparecen hasta después de los 60 años.

Concretamente en la enfermedad de Alzheimer, la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide se llama APP. Tanto ella misma como los enzimas que se encargan de su corte o procesado han sido localizadas en las MAM. En el año 2002 se describió que uno de estos enzimas proteolíticos era el encargado de cortar la APP dando lugar al  $\beta$ -amiloide que parecía acumularse. Esos hallazgos que se hicieron hace más de diez años respaldan el papel importante de las MAM en

esta patología. A pesar de ello, hay varias discrepancias en torno a las MAM y las enzimas que cortan el APP que todavía no están completamente entendidas. Los modelos experimentales y enfoques utilizados en varios estudios ya realizados están ofreciendo claros vínculos y alteraciones en los lípidos y la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  provocados por una conexión que queda perturbada entre el RE y las mitocondrias que podría ser un factor importante en la patogénesis del Alzheimer. Esto es un *link* que debería estudiarse más a fondo.

Además del problema que conlleva la acumulación del  $\beta$ -amiloide como es el mal funcionamiento de la maquinaria celular en general, hay otras funciones descritas hace algunos años que perjudican a las mitocondrias, entre otros orgánulos. Esta es la entrada masiva de iones calcio al interior de las neuronas debido a que el  $\beta$ -amiloide puede insertarse en la membrana plasmática y actuar como canales de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este hecho potencia la excitotoxicidad, un evento que ocurre en todas las enfermedades neurodegenerativas crónicas y agudas. Para hacernos una idea, la excitotoxicidad aparece cuando las neuronas sufren una entrada masiva y sin control de calcio que, cuyo aumento de concentración, activa toda una serie de vías de señalización de las cuales, muchas, actúan directamente sobre las mitocondrias. El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias aumenta la producción de radicales libres de oxígeno (ROS), inhibe la síntesis de ATP (la molécula que otorga energía en los procesos moleculares), induce la apertura de canales en las mitocondrias llamados PTP (por sus siglas en inglés) y promueve la liberación del citocromo c al citoplasma, lo que provoca el inicio de la apoptosis.

Otra enfermedad neurodegenerativa con cierta vinculación de las MAM es el **Parkinson**. Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común por detrás del Alzheimer. Se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas en una zona del cerebro llamadas sustancia nigra y también por la acumulación de inclusiones intracelulares llamadas cuerpos de Lewy. Estos cuerpos, como se ha dicho con anterioridad, son acumulaciones de una proteína, la  $\alpha$ -sinucleína. La mayoría de los casos de Parkinson son esporádicos y probablemente causados por toxinas ambientales, pero alrededor del 5-10% de los casos son de origen genético. Las primeras evidencias que se tuvieron donde se relacionó la disfunción mitocondrial con esta patología fue en 1983 al observarse que las neuronas afectadas acumulaban mucho estrés oxidativo.

Actualmente se conocen unas pocas proteínas relacionadas con las mitocondrias de forma directa o indirecta que están relacionadas con el Parkinson. Sin dar más detalles de los recomendados, solo cabe decir que los nombres de estas proteínas son PINK1, Parkina, LRRK2 y la más novedosa de todas, entre algunas otras, es la propia  $\alpha$ -sin. Estudios recientes han demostrado que  $\alpha$ -sin se acumula en las mitocondrias aumentando de forma perjudicial los niveles de calcio y, como consecuencia, los niveles de óxido nítrico, el daño oxidativo y la liberación de citocromo c seguido de la muerte de la neurona. Lo más sorprendente es que  $\alpha$ -sinucleína no se acumula en las mitocondrias por alguna acción vinculada a la patología, sino que es posible que su ubicación y función principal en, posiblemente la regulación del calcio, se encuentre directamente en las mitocondrias, concretamente en las zonas MAM. He aquí un



nuevo ejemplo de cuán importante y trascendental es el buen funcionamiento de estas zonas de contacto entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático.

El **Huntington** es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de las neuronas de tipo GABAérgicas de la zona del cerebro llamado estriado. Los síntomas principales son la motilidad deteriorada que provoca la conocida corea, demencia y otros defectos neuropsiquiátricos. La causa genética es la expansión anormal de repeticiones llamadas CAG en el gen que codifica la proteína huntingtina (htt). Las formas mutantes de htt contienen más de 35 repeticiones erróneas de CAG y hay una correlación directa entre el número de repeticiones y la gravedad de la enfermedad. Htt es una proteína localizada principalmente en el citosol de la célula, pero también se encuentra en los compartimentos del RE, las mitocondrias, en el núcleo y en el aparato de Golgi. Sus funciones exactas todavía se desconocen, aunque se ha detectado su participación en la regulación de la transcripción, en varias funciones mitocondriales, la producción de ROS, el tráfico de orgánulos y la apoptosis. Su conexión con el tema de este artículo es que recientemente también se ha detectado htt en las zonas MAM. A día de hoy todavía no se tienen ideas claras de lo que puede estar haciendo o hasta que punto podría estar perjudicando la enfermedad desde esta ubicación.

## La proteína Mitofusina 2 como puente de unión en las zonas MAM

El proceso de fusión en sí de las mitocondrias requiere la coordinación de sus membranas externas e internas, asegurando el mantenimiento de la compartimentación. Las Mitofusinas (Mfn) se ubican en la membrana externa y en humanos presentan una gran homología (81%) y una topología muy similar. La sobre-expresión de cualquiera de las dos mitofusinas es suficiente para promover la agregación de las mitocondrias y la disminución de sus niveles dan lugar a mitocondrias fragmentadas.

A pesar de sus similitudes, Mfn2 presenta una actividad GTPasa inferior a Mfn1 pero una mayor afinidad al GTP. Además, Mfn2 tiene otras muchas funciones además de la fusión mitocondrial que no comparte con Mfn1:

- Es importante para el correcto desarrollo y mantenimiento del cerebelo.
- Protege las neuronas ante ROS, el daño al DNA y la excitotoxicidad.
- Interactúa con miembros de las familias Bcl-2 anti- y pro-apoptóticas protegiendo contra la apoptosis.
- También se localiza en la membrana del retículo endoplasmático (ER) mediando la conexión con las mitocondrias.
- Permite la unión de las proteínas motoras de la célula a las mitocondrias permitiendo su desplazamiento por los microtúbulos.
- Mutaciones en Mfn2 son la causa más común de padecer la enfermedad neurológica Charcot-Marie-Tooth type 2.
- Es capaz de arrestar el ciclo celular al inhibir a ERK.
- Regula el metabolismo mitocondrial al inducir la expresión y activación de los complejos I, IV y V del OXPHOS.

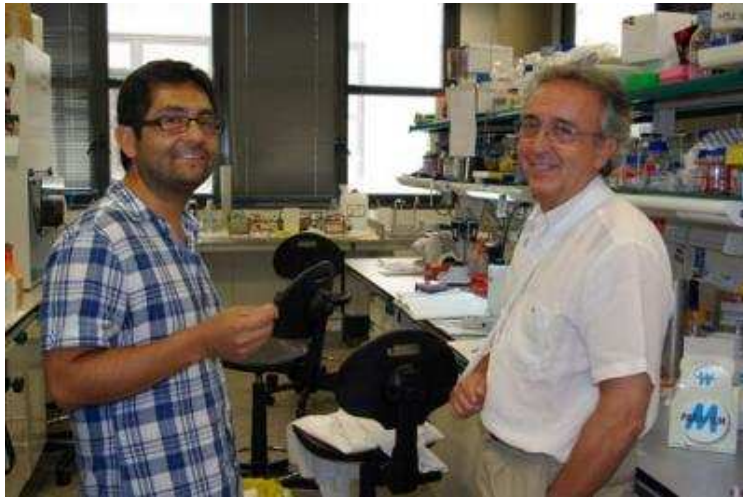
La estructura cristalina de Mfn no se ha obtenido todavía, pero desde 2006 es posible tener acceso a la estructura de la proteína BDLP de cianobacterias, reconocida como la proteína bacteriana homóloga de las mitofusinas. Los experimentos que se han llevado a cabo, apuntan a que las BDLP tienen que estar involucradas en un proceso de fusión de membranas en los puntos de unión entre bacterias permitiendo, por ejemplo, acciones tan básicas como la conjugación donde una bacteria le transfiere un plásmido (fragmento de ADN) a otra.

De entre todas las funciones de Mfn2, una de las más importantes para el tema que estamos tratando aquí es su papel como conector entre el RE y las mitocondrias. Esta conexión física se consigue gracias a que el RE también tiene Mfn2 que reconoce las de las mitocondrias. Se han realizado estudios donde la inhibición de Mfn2 o la reducción de sus niveles mediante distintas técnicas han dado lugar a una ligera fragmentación el retículo endoplasmático, un aumento en la distancia entre ambos orgánulos y problemas de captación de calcio. Además, se han obtenido resultados que avalan que menos Mfn2 reduce drásticamente la eficiencia del RE y las mitocondrias en la síntesis de lípidos. De hecho, mitofusina 2 promueve la unión entre ambos desde las zonas MAM.

Se han descrito con cierto detalle un puñado de proteínas que se encuentran situadas en las zonas MAM de diversos tipos celulares. De todas formas, esto no determina que todas las zonas de conexión entre ambos orgánulos estén compuestas del mismo tipo de proteínas. Un estudio reciente de proteómica identificó más de 1212 proteínas asociadas a las MAM se clasificaron de acuerdo a sus funciones en los procesos biológicos, se descubrió que muchas de ellas eran de vital importancia para las mitocondrias como la fosforilación oxidativa, el metabolismo de los lípidos, el tráfico de calcio, etc.

La acumulación de pruebas indica que las MAM son estructuras subcelulares, versátiles y que promueven la señalización entre el RE y las mitocondrias. Investigaciones recientes han puesto de manifiesto y ampliado las funciones otorgadas a las MAM en toda una variedad de procesos celulares de síntesis y transporte de lípidos, estrés del RE, señalización del calcio, eliminación de las mitocondrias por mitofagia, etc. Si bien la atención debe enfocarse en responder la gran variedad de preguntas que todavía no han sido esclarecidas. No hay duda de que el ritmo creciente en el que campo de la investigación sobre las MAM se está moviendo, pronto tendremos respuesta a preguntas intrigantes como ¿qué vías de señalización se activan a partir de la comunicación establecida en las MAM?, ¿además del calcio, que otras moléculas de señalización son imprescindibles para los propósitos de la unión?, ¿cómo se podría actuar contra las MAM en beneficio de la célula para actuar contra ciertas enfermedades?

## Entrevista



Los Dres. Pablo Muñoz (izquierda) y Antonio Zorzano.

Para adentrarnos en el contexto de la proteína Mitofusina 2 (Mfn2) y la relevancia de las zonas MAM entre mitocondrias y retículo endoplasmático, se ha entrevistado al **Dr. Juan Pablo Muñoz**.

**Juan Pablo Muñoz** cursó la carrera de Bioquímica en la Universidad Austral de Chile y desarrolló su Tesis doctoral en Biología Celular y Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Su doctorado lo realizó en el área de las enfermedades neurodegenerativas y luego expandió sus conocimientos mediante un posdoctorado en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile en el área de los mecanismos de supervivencia celular de las células cardíacas.

Durante los últimos 5 años se encuentra desarrollando su segundo posdoctorado en el laboratorio del Dr. Antonio Zorzano, del cual se ha hablado en la introducción de este artículo.

**Pregunta (P): ¿Qué camino evolutivo crees que han pasado las mitocondrias pensando en su íntima comunicación con el RE?**

**Juan Pablo (JP):** Durante la evolución esta interacción surgió como una especialización que ha dado origen a la complejidad y plasticidad celular. Esta comunicación es clave en mantener la homeostasis de calcio, síntesis de ATP y lípidos y mantener un proceso metabólico tejido específico. Recientes publicaciones han demostrado que la pérdida de los contactos mitocondria-retículo endoplasmático alteran el metabolismo celular, induciendo un metabolismo tipo Warburg y pérdida de la diferenciación celular.

**P:** Esto podría dar lugar a pensar que las mitocondrias pueden tener su origen en la especialización del RE y no un origen bacteriano como se lleva tiempo especulando y comprobando, ¿qué crees?

**JP:** La teoría de la endosimbiosis de Lynn Margulis postula que una bacteria ancestral fue englobada por otro microorganismos para producir una nueva célula simbiote, actualmente esta es la teoría que más satisface los datos encontrados utilizando estudios genéticos. Sin embargo teorías como el origen de la mitocondria a partir del retículo han sido postuladas pero no han tenido trascendencia, debido a que no existes antecedentes científicos sólidos en relación a esta teoría. Cabe destacar que recientes investigaciones han demostrado que el peroxisoma tiene su origen en el retículo endoplasmático, lo cual está abriendo nuevas posibilidades a la investigación sobre el origen de los orgánulos.

**P:** Centrándonos ya en una de las proteínas de tus investigaciones, Mfn2, ¿qué papel y función o funciones crees que debe estar jugando en las zonas de comunicación MAM (*Mitochondrial Associated ER Membrane*) entre ambos orgánulos?

**JP:** Al parecer las MAM son complejas estructuras proteicas (se han descrito cerca de 30 proteínas que componen las MAM) donde se decide el destino celular. Es importante destacar que en estos sitios están en directa comunicación los procesos de biosíntesis de proteínas y la capacidad bioenergética celular. Por ejemplo, se ha descubierto que bajo condiciones de estrés celular, en las que es necesario incrementar la síntesis de ATP, las mitocondria se acercan al retículo y se favorece la fosforilación oxidativa. Mfn2, una proteína integral de estas estructuras efectúa un papel relevante en este proceso. Desde su descubrimiento hace 10 años atrás, se asumía que Mfn2 cumplía un papel solo en dinámica mitocondrial, pero los nuevos descubrimientos han demostrado que esta proteína cumple un papel importante en la coordinación de la señalización de orgánulos. En este momento sabemos, que Mfn2 cumple un papel crucial para mantener la estructura del retículo y la mitocondria, y la disminución de la expresión de Mfn2 conduce a alteraciones en las señales de calcio, estrés oxidativo y metabolismo.

Nuevas investigaciones sugieren que esta proteína es un sensor del nivel de estrés celular, además, un reciente artículo en *Current Biology* demostró que Mfn2 participa en la interacción de melanosomas (unas estructuras similares a los lisosomas) con las mitocondrias. Son muchas las incógnitas actuales acerca de la comunicación entre orgánulos, debemos recordar que solo actualmente tenemos tecnologías que nos permiten analizar con alta resolución los procesos dinámicos subcelulares en células vivas. Previamente los estudios eran realizado en células fijadas y utilizando técnicas bioquímicas

**P:** De todas las funciones que lleva a cabo Mfn2 en general, no solamente en las zonas MAM, ¿cuál de ellas te parece más interesante y con más relevancia?

**JP:** En la actualidad pienso que una de la más interesante es la participación de Mfn2 en autofagia (un proceso que tiene el propósito de degradar orgánulos y agregados proteicos en condiciones de estrés celular), un reciente artículo en *Nature Cell Biology* demostró que los sitios de contacto RE-mitocondrias mediados por Mfn2 son necesarios para la formación de autofagosomas. Estas investigaciones han abierto una inesperada y nueva área en la

investigación sobre la función de Mfn2. Cabe destacar que este hallazgo es importante tanto para la investigación de enfermedades donde se produce agregación de proteínas y daño en los orgánulos, tal como Alzheimer y Parkinson, y además en el proceso de desarrollo embrionario, donde sabemos que la autofagia es crucial para que este proceso ocurra correctamente.

**P: El papel de Mfn2 parece ser realmente de mucha importancia pero ¿qué es lo que la hace ser tan imprescindible para la célula?**

**JP:** Mfn2 probablemente es un importante avance evolutivo, en mamíferos existen 2 proteínas involucradas en la fusión de membrana externa de la mitocondria, Mfn2 y Mfn1 las cuales poseen cerca de un 90% de homología de secuencia proteica, pero son codificadas en cromosomas diferentes. Cuando se descubrieron se pensaba que eran redundantes en su función, pero ahora se ha descrito que las pequeñas diferencias en su secuencia otorga propiedades muy diferentes a estas proteínas, las cuales son independientes de su función en dinámica mitocondrial. Nuestros trabajos han demostrado que Mfn2 regula la UPR, una compleja señal activada en el ER y que induce la activación de un conjunto de factores transcripcionales involucrados en la respuesta antioxidante, síntesis de proteínas, autofagia y metabolismo.

**P: Este tipo de comunicación entre ER y mitocondrias nos pueden hacer pensar que los orgánulos de la célula en realidad están en íntima relación entre todos, en cambio de ser entes individuales ¿qué opinas sobre esto?**

**JP:** En relación a esto los datos actuales son bastante claros, por ejemplo se ha descrito que el retículo endoplasmático está en conexión con peroxisomas, el núcleo, la membrana plasmática, la mitocondria y las vesículas endosomales. Todos estos datos han sido obtenidos utilizando técnica de microscopía electrónica y son conocidos desde hace mucho tiempo. Actualmente son un importante tópico de investigación debido a la aparición de nuevas tecnologías, debe recordarse que la bioquímica convencional de aislar orgánulos se basa en homogenizar los tejidos, esto destruye la fina arquitectura subcelular.

**P: Siguiendo con este tema, siempre se nos muestran las células dibujadas en los libros y los artículos científicos donde todos los orgánulos se ven separados y sin establecer comunicaciones, ¿crees que esta perspectiva debería cambiar y que los libros y artículos deberían adaptarse a la nueva percepción que se tiene sobre la célula?**

**JP:** Por supuesto, cuando vas a un libro de biología celular clásica los contactos apenas son mencionados, pero actualmente, muchas revisiones en el campo ya integran el concepto de comunicación entre orgánulos. En relación a que debería ser considerado te daré un ejemplo muy simple, siempre nos enseñan que la mitocondria produce ATP en forma mucho más eficiente que la glicolisis. Pero qué pasa con este ATP sintetizado, aun no se han dilucidado completamente los mecanismos por los cuales el ATP es canalizado al retículo endoplasmático.

**P:** Para terminar y agradeciéndote enormemente tu colaboración, ¿qué otras funciones crees o predices que se llegarán a conocer y descubrir sobre las mitocondrias?

**JP:** Creo que aún nos queda mucho por descubrir, en relación a las señales desde la mitocondria a núcleo o la interface ER-mt. Además nuevos descubrimientos en el área tales como, los del grupo de Heidi McBride donde han descrito la existencia de vesículas derivadas de la mitocondria (MDV) las sirven para intercambiar componentes entre mitocondria y peroxisoma. Aun hay mucho que aprender, además todo este conocimiento generado debes adicionar la variación dependiente del tejido celular, son muy diferentes las mitocondrias en neuronas y corazón por ejemplo.

### **Bibliografía:**

- Demuro, A. et al. (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem*, 280:17294-17300.
- Fernandez, MG. et al. (2002) Early changes in intramitochondrial cardiolipon distribution during apoptosis. *Cell Growth Differ*, 13(9):449-455.
- Hardy, J. & Selkoe, DJ. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580):353-356.
- Porter, KR. et al. (1945) A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations. *J Exp Med*, 81(3):233-246.
- Rizzuto, R. et al. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $Ca^{2+}$  responses. *Science*, 280(5370):1763-1766.
- Ruby, JR. et al. (1969) Continuities between mitochondria and endoplasmic reticulum in the mammalian ovary. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 97(1):30-37.
- Schon EA, and Przedborski S. (2011) Mitochondria: the next (Neuro)generation. *Neuron Review*, 70:1033-1053.
- Vance, JE. (1990) Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*, 265(13):7248-7256.
- Zorzano, A. et al. (2009) Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Review*, 89:799-845.

### **Bibliografía de figuras:**

- **Figura portada:** Reconstrucción tridimensional de una fotografía tomada por el autor de este artículo mediante microscopía confocal. En color verde se muestra el retículo endoplasmático y en color rojo las mitocondrias.
- **Figura 1:** Westermann, B. (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews*, 11:872-884.
- **Figura 2:** Kuroiwa, T. et al. (2006) Structure, function and evolution of the mitochondrial division apparatus. *BBA*, 1763:510-521.
- **Figura 3:** Rowland, AA and Voeltz, GK (2012) Endoplasmic reticulum – mitochondria contacts: function of the junction. *Nature Reviews*, 13:607-615.
- **Figura 4:** Klecker T, et al. (2014) Making connections: interorganelle contacts orchestrate mitochondrial behavior. *Trends in Cell Biology*, 14.