



**Fundació**  
La Marató de TV3

XVII SIMPOSIUM

Lesiones medulares y cerebrales adquiridas



## ESTUDIO Y MANIPULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MFN2 EN LA EXCITOTOXICIDAD

**Francesc Xavier Soriano Zaragoza**

Facultat de Biologia UB



## 1. Resumen

El ictus se produce como consecuencia de una reducción permanente o transitoria del flujo sanguíneo en una región del cerebro regado por una arteria cerebral. Durante un episodio de isquemia, los niveles de glutamato extracelular aumentan debido a la liberación sináptica y al mal funcionamiento de los mecanismos de captación. Este glutamato induce una activación excesiva del receptor de NMDA, provocando la muerte neuronal por excitotoxicidad, que puede ser necrótica o apoptótica, dependiendo de la duración e intensidad de la activación. En estudios clínicos se han probado distintos agonistas de los receptores de glutamato como agentes neuroprotectores en casos de isquemia cerebral. Desafortunadamente, sus graves efectos secundarios impiden su uso. Por tanto, se precisan nuevas estrategias para incrementar las escasas intervenciones terapéuticas contra el ictus.

La fragmentación mitocondrial juega un papel determinante en los procesos de muerte celular. Mitofusina 2 (Mfn2) es una proteína de fusión mitocondrial que cuando se elimina provoca fragmentación mitocondrial y defectos bioenergéticos. Estudios con ratones sin el gen de Mfn2 muestran que es necesaria para la supervivencia neuronal. La expresión de Mfn2 protege las neuronas contra especies reactivas de oxígeno, daño en el DNA y contra la excitotoxicidad. Además de regular la morfología mitocondrial, Mfn2 también regula el metabolismo, protege contra la apoptosis al interactuar con Bcl-2 y bloquear la activación de Bax, controla el contacto entre el retículo endoplasmático y la mitocondria, lo cual es muy importante para la homeostasis del calcio, interviene en la motilidad mitocondrial en neuronas, y bloquea la entrada en el ciclo celular al inhibir la señalización por ERK/MAPK. Todas estas funciones de Mfn2 pueden proveer protección contra la muerte neuronal.

En este proyecto hemos determinado que de todas las proteínas que conforman la maquinaria de fusión/fisión mitocondrial, solo Mfn2 se encuentra reducida en condiciones excitotóxicas, y lo hace de forma irreversible en una fase tardía del proceso excitotóxico. La reducción de los niveles de Mfn2 provoca disfunción mitocondrial, alteraciones en los niveles de calcio y facilita la traslocación de la proteína proapoptótica Bax a la mitocondria, provocando muerte neuronal tardía. Así pues, la reducción de los niveles de Mfn2 es un proceso tardío en excitotoxicidad y, por

tanto, se muestra como una posible diana terapéutica que podría ayudar a ampliar la estrecha ventana terapéutica respecto al ictus.

## 2. Resultados

### 1. Las proteínas de fusión/fisión mitocondrial en condiciones excitotóxicas.

La dinámica mitocondrial desempeña un papel central en la muerte neuronal. Para entender con mayor detalle los mecanismos por los que las mitocondrias se fragmentan durante la excitotoxicidad, tratamos cultivos primarios de neuronas corticales de rata a dosis moderadas (30  $\mu$ M) de NMDA durante distintos tiempos. Lo que observamos fue que la única proteína de la maquinaria de fusión/fisión mitocondrial que disminuía fue Mfn2. Esta disminución se observó a partir de las 4 horas del inicio de la lesión excitotóxica.

Con el fin de comprobar *in vivo* la relevancia fisiopatológica de los resultados, provocamos daño isquémico a ratas mediante la oclusión permanente de la arteria cerebral media y 90 minutos de oclusión transitoria de la carótida. El análisis de expresión de las proteínas de la maquinaria de fusión/fisión mostró un patrón de expresión similar. Mfn2 fue la única proteína que disminuía sus niveles y lo hacía horas más tarde de producirse la lesión.

A pesar de que la reducción de los niveles de Mfn2 en excitotoxicidad se produce horas después de iniciarse la lesión, la fragmentación mitocondrial se produce rápidamente (30-60 minutos). Por tanto, estudiamos por qué proceso se producía la fragmentación mitocondrial en excitotoxicidad. Lo que descubrimos fue que la fragmentación mitocondrial se producía en dos fases. La primera fase dependía de la traslocación de la proteína de fisión Drp1 a la mitocondria, la cual dependía de su nitrosilación por la NOS y la contracción del complejo de la actomiosina mediado por ROCK. La retirada del estímulo excitotóxico revertía esta primera fase de la fragmentación. La segunda fase de la fragmentación mitocondrial en excitotoxicidad se producía horas después de iniciarse la lesión, dependía de la reducción de los niveles de Mfn2 y era irreversible, tenía lugar aunque se hubiese retirado la lesión con anterioridad.

## **2. Mecanismo por el que se reduce la expresión de Mfn2 en excitotoxicidad.**

Determinamos que la disminución de la expresión de Mfn2 no se debía a un proceso proteolítico, sino a nivel transcripcional. Asimismo caracterizamos el mecanismo concreto por el que se produce esta represión. MEF2 es un factor de transcripción que es degradado por caspasas y calpaína en condiciones excitotóxicas. Igualmente observamos que la degradación de MEF2 a lo largo del tiempo durante la excitotoxicidad correlacionaba muy bien con la disminución de los niveles de Mfn2, tanto *in vitro* como *in vivo*. A continuación obtuvimos toda una serie de evidencias de que en neuronas MEF2 regula la expresión basal de Mfn2 y que al degradarse MEF2 se reduce la expresión de Mfn2 y, por tanto, sus niveles. Las evidencias que obtuvimos son las siguientes:

- 1) Neuronas transducidas con una forma mutada de MEF2 que actúa como un dominante negativo (MEF2-DN) tienen reducidos los niveles de Mfn2, tanto a nivel de mRNA como de proteína.
- 2) En ensayos con genes indicadores. MEF2-DN reprime la actividad del promotor de Mfn2 específicamente en neuronas, pero no en una línea celular que prácticamente no expresa MEF2 (y expresa mucho menos Mfn2 que las neuronas).
- 3) Mediante deleciones del promotor de Mfn2 y mutagénesis dirigida se determinó el lugar de unión de MEF2 al promotor de Mfn2.
- 4) Ensayos de EMSA mostraron que MEF2 se une *in vitro* a la caja identificada del promotor de Mfn2.
- 5) Ensayos de ChIP mostraron que MEF2 se une al promotor de Mfn2 en neuronas en condiciones basales, y que esta unión se pierde cuando las neuronas se exponen a dosis excitotóxicas de NMDA.

## **3. Papel neuroprotector de Mfn2 contra la excitotoxicidad.**

El hecho de que la reducción de los niveles de Mfn2 se produzca de forma tardía durante el proceso excitotóxico es importante, porque en la actualidad el único tratamiento farmacológico recomendado contra el ictus isquémico es la administración del trombolítico tPA, pero este solo es efectivo si se administra durante las primeras cuatro horas desde el inicio del ataque. Por tanto, es de suma importancia encontrar nuevas dianas para poder ampliar esta ventana terapéutica.

Son distintos los mecanismos que pueden participar en la muerte por excitotoxicidad. Durante las primeras fases la muerte se produce mayoritariamente por necrosis,

mientras que en las fases tardías la muerte es por apoptosis. Observamos que la reducción de los niveles de Mfn2 contribuía a la muerte tardía por apoptosis, pero no tenía ningún papel en la muerte por necrosis. Mientras la sobreexpresión de Mfn2 protegió contra la excitotoxicidad, la disminución de los niveles de Mfn2 mediante shRNA sensibilizaba a dosis subtóxicas de NMDA. Con el papel de MEF2 regulando la expresión basal de Mfn2, la sobreexpresión de MEF2-DN también sensibilizó a las neuronas a dosis subtóxicas de NMDA.

#### **4. Mecanismo por el que Mfn2 protege contra la excitotoxicidad.**

Dos características de la excitotoxicidad son la disfunción mitocondrial y la alteración en la homeostasis del calcio. Experimentos de respirometría demostraron que la disminución de los niveles de Mfn2 provoca disfunción mitocondrial. Usando otra aproximación experimental, la medida del potencial de membrana mitocondrial, observamos resultados similares y, además, que la disfunción mitocondrial empeoraba dramáticamente cuando se forzaba la función mitocondrial a dosis subtóxicas de NMDA.

Dado que la mitocondria juega un papel clave en el taponamiento de los incrementos de calcio citosólico que se producen durante la excitotoxicidad, y este taponamiento depende de una correcta función mitocondrial, razonamos que la homeostasis del calcio está afectada en las neuronas con expresión reducida de Mfn2. Observamos que el incremento en el calcio del citosol se incrementaba mucho más al aplicar NMDA en neuronas con expresión reducida de Mfn2, i que consecuentemente los niveles de calcio mitocondrial eran menores en estas neuronas.

De acuerdo con el aumento del calcio del citosol en las neuronas con expresión reducida de Mfn2, se observó una mayor activación de la calpaína, proteasa dependiente del calcio que actúa como mediadora de la muerte por excitotoxicidad. Se ha demostrado que Mfn2 interacciona con miembros de la familia de proteínas de Bcl-2, tanto apoptóticas como antiapoptóticas. Observamos que la disminución de la expresión de Mfn2 facilita la localización e inserción de la proteína proapoptótica Bax en la mitocondria, con el consiguiente aumento en la liberación del citocromo c y la muerte por apoptosis.

### 3. Relevancia y posibles implicaciones

Este es un proyecto de ciencia básica, pero con implicaciones clínicas muy interesantes. En la actualidad el único tratamiento farmacológico aprobado para el ictus isquémico es la administración del activador del plasminógeno tisular (tPA), pero esta administración debe realizarse durante las primeras cuatro horas desde que se inicia el ataque. Sin embargo, la evolución del daño isquémico es progresivo, iniciándose durante los primeros minutos y durando horas e incluso días. Por tanto, es de gran importancia encontrar nuevas dianas que permitan ampliar la ventana terapéutica. En este estudio hemos demostrado que la expresión reducida de Mfn2 es un hecho tardío en el proceso excitotóxico (cuatro horas desde el inicio de la lesión). La reducción en la expresión de Mfn2 provoca disfunción mitocondrial, altera la homeostasis del calcio y facilita el reclutamiento de Bax en la mitocondria durante la excitotoxicidad. Todo ello sugiere que la reducción de Mfn2 puede determinar el destino de la neurona (muerte o supervivencia) en la zona de penumbra, que es aquella más relevante clínicamente para tratar el ictus isquémico. Por tanto, Mfn2 es una potencial diana terapéutica contra la excitotoxicidad en el ictus.

Haber descubierto que la reducción de los niveles de Mfn2 se produce principalmente a nivel transcripcional y que tal reducción en la expresión facilita la traslocación de Bax a la mitocondria, puede sugerir posibles estrategias terapéuticas. Por ejemplo, usando librerías de moléculas y ensayos de cribado de activadores del promotor de Mfn2 podrían identificarse moléculas que evitasen la disminución de la expresión de Mfn2 en excitotoxicidad. Igualmente podrían incrementarse los niveles de RNA de Mfn2 utilizando RNA sintéticos modificados (modRNA), los cuales son una estrategia emergente para administrar de forma controlada productos génicos, tanto temporal como espacialmente. Una tercera posibilidad pasaría por entender con mayor detalle cómo la deficiencia de Mfn2 facilita la localización de Bax en la mitocondria. Si dependiese de cambios en la interacción de Mfn2 con Bax u otros miembros de la familia de proteínas Bcl-2, un mapeo detallado de los dominios involucrados en estas interacciones permitirían diseñar péptidos fusionados al péptido TAT para administrarlos al interior de la neurona y que interfiriesen con estas interacciones, y, por tanto, bloqueasen la localización mitocondrial de Bax.

#### 4. Bibliografía generada

- Martorell-Riera A, Segarra-Mondejar M, Reina M, Martínez-Estrada OM, Soriano FX.  
*Mitochondrial fragmentation in excitotoxicity requires ROCK activation.*

**Cell Cycle.** 2015. 14(9): 1365-1369.

- Martorell-Riera A, Segarra-Mondejar M, Muñoz JP, Ginet V, Olloquequi J, Pérez-Clausell J, Palacín M, Reina M, Puyal J, Zorzano A, Soriano FX.  
*Mfn2 downregulation in excitotoxicity causes mitochondrial dysfunction and delayed neuronal death.*

**EMBO J.** 2014. Oct 16;33(20):2388-407