



Papel de Alex3 en la vía de señalización de Wnt y en la dinámica mitocondrial

Román Serrat Reñé

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

Papel de Alex3 en la vía de señalización de Wnt y en la dinámica mitocondrial

ROMÁN SERRAT REÑÉ

Barcelona, Marzo 2012

Programa de Doctorado en Biomedicina

Bienio 2006-2007

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

Esta memoria es presentada por **Román Serrat Reñé**, licenciado en Biología, para optar al grado de Doctor en Biomedicina.

Los estudios de tercer ciclo se han enmarcado en el programa de doctorado en Biomedicina, bienio 2006-2007, de la Universidad de Barcelona y el proyecto de Tesis Doctoral está adscrito al Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de esta memoria han sido dirigidos y supervisados por el **Dr. Eduardo Soriano García** y por el **Dr. Ferran Burgaya i Márquez**.

Barcelona, Marzo de 2012.

Visto bueno de los directores de Tesis:

Dr. Eduardo Soriano García

Dr. Ferran Burgaya i Márquez

El candidato a Doctor:

Román Serrat Reñé

“Hay una ley de vida, cruel y exacta, que afirma que uno debe crecer o, en caso contrario, pagar más por seguir siendo el mismo”

Norman Mailer (1923-2007) Escritor estadounidense.

“La vida es muy peligrosa. No por las personas que hacen el mal, sino por las que se sientan a ver lo que pasa.”

Albert Einstein (1879-1955) Científico alemán nacionalizado estadounidense.

“Me he dedicado a investigar la vida y no sé por qué ni para qué existe.”

Severo Ochoa (1905-1993) Médico español.

Agradecimientos

Puuffffff!!!!, por donde empezar... Ahora que llego al final de mis estudios... “final”... pues sí, creo que sí, que ya puedo decir que termino ¿no? La verdad es que ya ni me acuerdo de cuando comenzó esto de los “estudios”. Que si primero guardería, que si luego colegio, que nos vamos al instituto, después la Universidad y cuando parece que terminas, pues master y una tesis doctoral, o mejor dicho: “estudios de doctorado”. 27 años y pico y termino “ahora”,... pues mucho me temo que si tengo que dar gracias a todas las personas que de alguna forma me han ayudado a llegar hasta aquí, más de uno se me olvide, así que, por si acaso, gracias a todos aquellos que me voy a olvidar, que por desgracia seguro serán muchos y estoy seguro que ocuparon, ocupan o ocuparan un lugar importante a lo largo de mi vida.

Las primeros nombres para las que voy a dedicar estos agradecimientos son para mis directores de tesis Eduardo y Ferran, que me han ayudado en no pocas ocasiones y sin los cuales esta tesis no hubiera podido hacerse. Gracias por vuestros consejos y comentarios que me han guiado en estos años de doctorado y por toda la experiencia investigadora que me habéis permitido adquirir y por la que, a pesar de temporadas más fáciles o más difíciles, ahora me puedo sentir orgulloso. Y por supuesto, muchas gracias también para todos aquellos con los que he colaborado en esta tesis y que me habéis dado la oportunidad de trabajar con vosotros y aprender nuevas técnicas que sin duda han sido de gran utilidad para mi formación como Doctor.

Sin dejar el mundo laboral, pero quizás llegando más al personal, no puedo dejar de agradecer al “Alex3 Team”, tanto engendros como engendrador, sabéis de sobra que a vosotros no os tengo que daros gracias por esta tesis, sois parte de ella y desde luego, aunque este tipo de cosas no sean lo mío, he sido muy afortunado de poder trabajar con vosotros. A mi “tercer director” decirle que no se como has tenido tanta paciencia macho, y pensar que tenias que llegar pronto todos los días, jeje, así es como te conocí, y bueno, ya sabes que te he hecho caso en la mitad de las cosas y en las otras... pues lo discutimos con dos cervezas... y a la señorita del equipo, a ver si me dejabas de odiar un poco y por lo menos confío en que hayas podido aprender algo de provecho. Mucha suerte para los que continuáis con Alex!!! Y es que con vosotros, y con todo el laboratorio en general, supongo que tanto con los Santos como con las no tan Santas, no solo he trabajado sino que me he divertido mucho dentro y

fuera del parque ;), y eso es quizás lo que más valoró de estos años de doctorado, ya sabéis que os lo agradezco y os deseo lo mejor allí donde estéis o vayáis a estar y recordad que igual os hago alguna visitilla jeje.

También agradezco el haber llegado hasta aquí a mis compañeros de Universidad, tantos y tan variados que la verdad es que me puedo sentir contento, alguno de vosotros esta intentando acabar también esto de los estudios de doctorado, a ver si podéis tener la misma suerte. Os doy las gracias también a vosotros que me habéis permitido celebrar muchas haimas, me habéis dejado trabajar de vigilante, hemos compartido prácticas, clases y hasta residencia y en general me habéis permitido tener otra gran familia en Barcelona jeje. Algunas veces desearía poder vivir otra Universidad, pero con lo que cuesta, casi mejor que simplemente repetimos Túnez ¿no?...

Echando la mirada hacia atrás (y ha medida que se va difuminando la memoria), no puedo dejar de agradecer a mi ciudad natal, Binéfar, y sabéis que por Binéfar me refiero a todos vosotros que me habéis visto crecer y llegar a lo que soy. Desde verme caer en el patio del colegio y clavarme una piedra hasta los días de hoy donde las nuevas generaciones van haciéndose paso y con los que estamos tan unidos, ya sea bajo AJAC o bajo Interchamizos. Con vosotros he vivido buenos y no tan buenos momentos, he llorado, he reído, he disfrutado, he soñado con ser Biólogo, he sido del Equipo "B", he ido a correr, con o sin pantalones, he soñado con viajar muy lejos (y aun confió en que podamos), he ido "alguna que otra" fiesta y, en general, he tenido tantas y tan innumerables experiencias, que todos sabéis que si algún día escribiésemos un libro... pero casi mejor que no, que tengo que ser una persona respetable jajajaja.

Pero bueno, finalmente, y sin duda, de los que no puedo olvidarme y a los que quiero dedicarles especialmente esta tesis no son otros que a mi familia. Ellos sí que me han acompañado desde que ni siquiera tengo recuerdos, me han apoyado en todos los momentos y han confiado en mí. Así que mis últimos y quizás más importantes agradecimientos, quiero que sean para ellos, para mis abuelos que siempre he admirado, para mis tíos, para mis primos, para mi cuñado, para mi sobrino Alex (que por azar de la vida su nombre me recuerda en algo a esta tesis) y especialmente para mis padres y para mi hermana, sabéis que sin vosotros no lo hubiera podido hacer, por ello...

Muchas gracias a todos!!!!

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1

1.- Dinámica mitocondrial

3

1.1.- Introducción

3

1.2.- Transporte mitocondrial

4

1.2.1.- A través de los microtúbulos

5

1.2.2.- A través de los filamentos de actina

8

1.2.3.- Regulación del transporte y distribución

9

1.3.- Mecanismos de fusión-fisión mitocondrial

13

1.3.1.- Fusión mitocondrial

13

1.3.2.- Fisión mitocondrial

18

1.4.- Mitofagia

24

1.5.- Dinámica mitocondrial y enfermedades neurodegenerativas

27

1.5.1.- Charcot Marie Tooth

27

1.5.2.- Atrofia Óptica Dominante

28

1.5.3.- Enfermedad de Alzheimer

28

1.5.4.- La enfermedad de Parkinson

29

1.5.5.- La enfermedad de Huntington

30

1.5.6.- Paraparesis espástica hereditaria

30

1.5.7.- Nuevo caso asociado a Drp1

31

2.- Vías de señalización a través de Wnts

33

2.1.- Introducción

33

2.1.1.- Las proteínas Wnts y sus receptores

34

2.2.- Vía de señalización canónica

36

2.3.- Vías de señalización no-canónicas

38

2.4.- Funciones asociadas a las vías de señalización de Wnt

40

Capítulo III: La proteína Armc10/SVH (ancestro de la familia Armcx)

también regula la dinámica mitocondrial e interacciona con el complejo

KHC/Miro/Trak2.

117

Capítulo IV: Generación de modelos in vivo. Resultados preliminares.

123

DISCUSIÓN Y RESULTADOS PRELIMINARES

127

A.- La familia de proteínas Armcx

129

B.- Papel de Alex3 y Armc10 en la función mitocondrial

132

C.- La vía de señalización Wnt/PKC regula los niveles de proteína de Alex3

138

CONCLUSIONES

145

BIBLIOGRAFÍA

149

INTRODUCCIÓN

1.- Dinámica mitocondrial

1.1.- Introducción

Las mitocondrias son orgánulos celulares que fueron caracterizados como los responsables de la producción de energía en la célula. Las mitocondrias son muchas veces consideradas como pequeñas centrales eléctricas en las que se produce la síntesis de ATP, mediante un proceso de fosforilación oxidativa, en el que se consume O₂ y se libera CO₂ (Han et al., 2010). Pero en las mitocondrias también se realizan otras muchas funciones como la homeostasis del calcio a nivel intracelular (Rizzuto, 2001) o la regulación de la apoptosis (Kroemer et al., 1998).

Estos orgánulos evolucionaron de una relación simbiótica entre una bacteria aeróbica y células eucariotas primordiales (Wallace, 2005) y, como vestigios de este origen simbiótico, las mitocondrias se caracterizan por la posesión de una doble membrana lipídica, así como, por albergar en su interior su propio DNA (mtDNA), si bien estas estructuras han continuado evolucionando para desarrollar su función de productoras de energía. Actualmente la gran mayoría de proteínas mitocondriales son sintetizadas por el DNA nuclear e importadas a estos orgánulos; pese a ello, el mtDNA todavía mantiene un genoma que es esencial para la respiración celular y que codifica para 13 proteínas, 22 tRNAs y 2 mRNAs (Wallace, 2005). Por su parte, la membrana mitocondrial interna se encuentra replegada formando unas estructuras denominadas crestas mitocondriales, que también tienen mucha importancia en el proceso de la apoptosis.

Aunque originalmente las mitocondrias eran observadas como orgánulos individuales de forma arriñonada, esta visión ha ido cambiando a lo largo de los años y actualmente son consideradas como una red mitocondrial donde se producen numerosos eventos de fusión y fisión y en las que el transporte y de degradación a través de autofagia están altamente regulados (Chen and Chan, 2004; Chen and Chan, 2009). La importancia de la dinámica mitocondrial ha sido descrita tanto en procesos fisiológicos de desarrollo y envejecimiento como en condiciones patológicas de una gran variedad de enfermedades como Alzheimer (AD), Parkinson (PD), la enfermedad de Huntington (HD), Charcot-Marie-Tooth (CMT) o Atrofia óptica dominante (DOA) (Chan, 2006a; Cho et al., 2010; Han et al., 2010).

Aunque las mitocondrias son orgánulos críticos para todas las células, las neuronas son extremadamente dependientes de la correcta función de las mitocondrias (Nicholls and Budd, 2000; Han et al., 2010). Las neuronas son células altamente especializadas con largos procesos como los axones y las dendritas. Además, estos procesos neuronales son muy activos en la transmisión de la señal intercelular mediante la liberación de neurotransmisores desde la sinapsis, proceso que requiera de grandes cantidades de energía (Chen and Chan, 2006). Por ello, la habilidad de las mitocondrias para fusionarse, dividirse y migrar para proporcionar

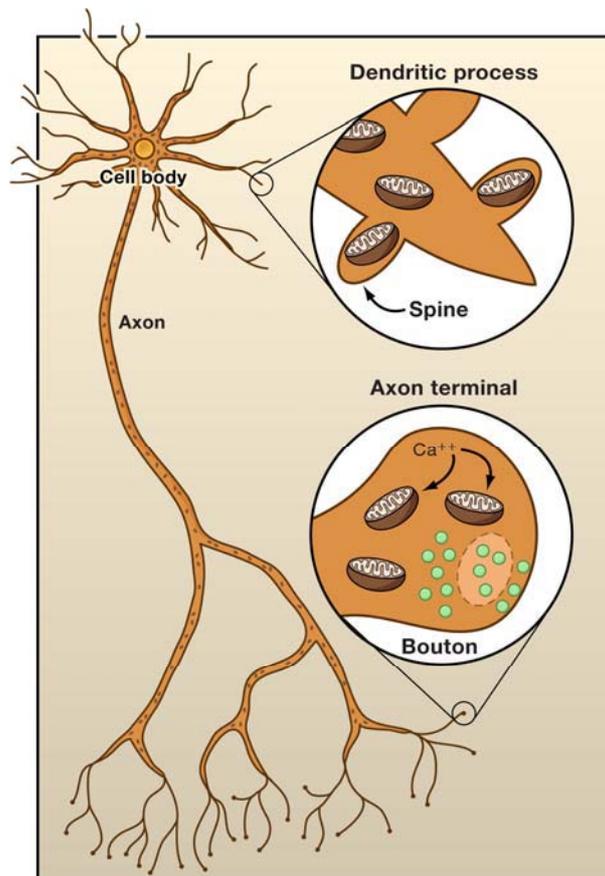
energía a través de los procesos neuronales, es particularmente importante para la función sináptica (Figura 1) (MacAskill et al., 2010). Además de una fuente de energía, las mitocondrias también juegan un papel crítico en la plasticidad sináptica a través del mantenimiento de la homeostasis del calcio (Li et al., 2004b). Asimismo, acumulaciones de mutaciones en el mtDNA se encuentran en los cerebros de avanzada edad y con neurodegeneración (Bossy-Wetzel et al., 2003; Chan, 2006a; Chen and Chan, 2006; Chen and Chan, 2009) y una coordinada fusión mitocondrial es importante para la estabilidad del mismo (Ono et al., 2001; Chen et al., 2010a). Estos datos demuestran que las neuronas son muy sensibles y vulnerables a una incorrecta función mitocondrial.

1.2.- Transporte mitocondrial

Las células necesitan que los componentes celulares y especialmente las mitocondrias, sean distribuidas por todo su espacio intracelular para poder llevar a cabo sus funciones de forma eficiente. Este hecho es de vital importancia para las neuronas debido a la enorme distancia que puede separar las regiones de acción de estos orgánulos del soma celular. Además, esta distribución, lejos de ser una distribución homogénea, responde a las necesidades celulares locales, acumulándose en las regiones de elevada demanda energética como son los conos de crecimiento y ramificaciones del axón (Morris and Hollenbeck, 1993; Ruthel and Hollenbeck, 2003), las terminales sinápticas (Li et al., 2004b; Chang et al., 2006a; Ly and Verstreken, 2006), nodos de Ranvier (Fabricius et al., 1993; Zhang et al., 2010a) y lugares de síntesis proteica en el axón (Martin et al., 1998).

Las mitocondrias interactúan con diferentes tipos de filamentos y usan diferentes tipos de mecanismos dependientes

Figura 1: Desafíos exclusivos para las mitocondrias en las neuronas. En la izquierda se puede observar una neurona con mitocondrias (óvalos marrones). Las mitocondrias viajan largas distancias desde el soma a los procesos dendríticos (arriba derecha) y axonales (abajo derecha). En el árbol dendrítico el reclutamiento de las mitocondrias a las profusiones (espinas) esta asociado con la actividad neuronal. En los botones del terminal nervioso, las mitocondrias son importantes para la homeostasis del Calcio y para el ciclo de las vesículas sinápticas (círculos verdes). Además las mitocondrias son necesarias para la correcta estructura y organización de los botones. Adaptación: (Chan, 2006a).



de la naturaleza de estos filamentos para controlar su morfología, distribución, movimiento e incluso función. Poco es conocido acerca de la participación de los filamentos intermedios en el transporte mitocondrial (Perrot and Julien, 2009), siendo los dos principales sistemas del citoesqueleto que regulan las características mitocondriales, el citoesqueleto de actina y los microtúbulos (Ligon and Steward, 2000; Hollenbeck and Saxton, 2005; Boldogh and Pon, 2007; Frederick and Shaw, 2007; Cai and Sheng, 2009a; Cai et al., 2011).

1.2.1.- A través de los microtúbulos

Las neuronas contienen una elaborada red de microtúbulos que radian desde el soma a las regiones terminales. En el caso de los axones, estos microtúbulos poseen una polaridad intrínseca, con el extremo “más” dirigido hacia los terminales y el “menos” hacia el soma celular, aunque en el caso de las dendritas la polaridad esta mezclada (Hirokawa and Takemura, 2004). La polaridad y organización del citoesqueleto en los axones es crítica para el correcto transporte de las mitocondrias desde el soma a la parte distal de los axones y a las sinapsis mediante proteínas motoras asociadas a los microtúbulos, que incluyen los miembros de las kinesinas (mayoritariamente dirigidos hacia el extremo “más”) y de las dineinas citoplasmáticas (hacia el extremo “menos”). De esta forma, las kinesinas generalmente median el transporte anterógrado y las dineinas conducen el transporte retrógrado en los axones (Pilling et al., 2006; Cai and Sheng, 2009a).

De entre los miembros de la familia de las kinesinas, la familia de la kinesina-1 ha sido asociada con las mitocondrias (Jellali et al., 1994; Khodjakov et al., 1998). La kinesina-1 contiene dos cadenas pesadas y dos ligeras. Las cadenas pesadas de la kinesina-1, conocidas como KIF5, pueden funcionar como motor y forman homo- o heterodímeros entre ellas. Cada cadena pesada KIF5, contiene un dominio motor N-terminal que se une directamente a los microtúbulos, mientras que su dominio C-terminal media la asociación con las cadenas ligeras o con los “carga” intracelulares. Es probable que las cadenas pesadas KIF5, sean el mayor responsable para el transporte axonal anterógrado de las mitocondrias. La alteración de KIF5b produce un anormal clustering perinuclear de las mitocondrias (Tanaka et al., 1998), mientras que mutantes de KIF5 en *Drosophila*, muestran un transporte mitocondrial alterado y una reducción en la distribución en los axones motores larvales (Hurd and Saxton, 1996). Un miembro de la familia de la kinesina-3 (KIF1B β) también ha sido asociado con el transporte mitocondrial en ratones. Se encuentra enriquecido en las neuronas, donde colocaliza, físicamente esta asociado, y soporta el movimiento de estos orgánulos a través de los microtúbulos en un ensayo “in vitro” (Nangaku et al., 1994). Recientemente una proteína similar a kinesinas, KLP6, también ha sido relacionada con la regulación del transporte mitocondrial en neuritas (Tanaka et al., 2011).

En el caso del transporte retrógrado, poco se sabe de las interacciones moleculares que

rigen este proceso. La dineína es un gran complejo molecular que comprende dos cadenas pesadas así como varias intermedias, ligeras intermedias y ligeras. La especificidad de interacción con el cargo depende de proteínas accesorias como la dinactina que, aunque no es esencial, se ha demostrado como mediador de la interacción. Algunos estudios demuestran que la dineína es necesaria para el correcto transporte mitocondrial retrógrado en el sistema nervioso de *Drosophila* y, que tanto dineína como dinactina, interaccionan con mitocondrias purificadas (Pilling et al., 2006). También se sabe que el Canal Selectivo e Aniones Dependiente de Voltaje (VDAC1) de la membrana mitocondrial externa interacciona con tctex1, una de las cadenas ligeras que forman la dineína (Schwarzer et al., 2002), si bien es de esperar que haya múltiples interacciones más que regulen la unión y reconocimiento de la dineína citoplasmática con su cargo mitocondrial.

Se cree que receptores en la superficie de las organelas son los responsables de enlazar la correcta maquinaria a con el cargo correcto. Mientras aun existen dudas acerca de si interacciones con los lípidos contribuyen al reclutamiento de motores a las membranas mitocondriales, varios complejos adaptadores han sido identificados para el link específico de la mitocondria con la maquinaria de transporte (Figura 2).

Sintabulina fue descrito como uno de estos adaptadores. Recientes estudios revelan un papel crítico de sintabulina en el transporte anterógrado de las mitocondrias en los procesos neuronales (Cai et al., 2005). Sintabulina se encuentra enriquecida en la fracción mitocondrial como una proteína asociada a membrana y

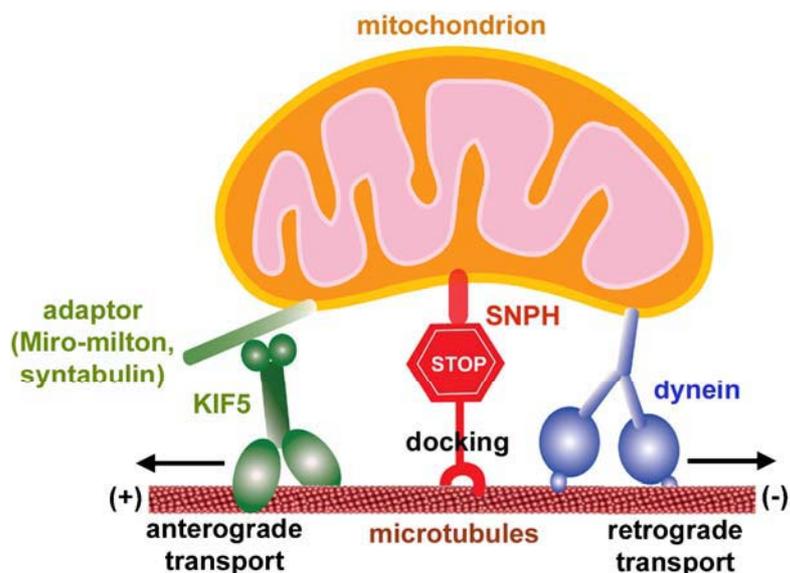


Figura 2: **Representación esquemática del transporte mitocondrial a través de microtúbulos.** La mitocondria es transportada anterógradamente a través de los motores kinesinas (KIF5), y de los correspondientes adaptadores. El transporte retrógrado es mediado por la dineína citoplasmática. Sintafilina (SNPH) actúa como receptor para la parada y anclaje de las mitocondrias en los axones y es requerido para el mantenimiento de un gran número de mitocondrias en un estado estacionario mediante la interacción con el citoesqueleto de microtúbulos. Adaptación: (Cai and Sheng, 2009a).

estudios de “live-imaging” demuestran que colocaliza y migra junto a la mitocondria en los procesos axonales. Silenciamientos de la expresión de sintabulina o el bloqueo de la interacción sintabulina-kinesina, cambian radicalmente la distribución de las mitocondrias en cultivos de neuronas hipocámpales, originándose un cluster en el soma y apareciendo

escasamente distribuidas en los procesos neuronales. La pérdida de función de sintabulina altera el transporte anterógrado pero no el retrógrado a través de los axones, lo que proporciona una evidencia directa de que sintabulina es un importante componente de la maquinaria de tráfico mitocondrial. Además, la correcta distribución mitocondrial, sintabulina también se ha descrito como importante para el mantenimiento de la transmisión sináptica en neuronas simpáticas (Ma et al., 2009).

Más evidencias existen acerca del papel que ejerce el complejo Miro/Trak2 en el transporte de las mitocondrias. Mutaciones en Milton, el ortólogo de Trak2 en *Drosophila*, forman sinapsis normales en los fotorreceptores, pero sus axones y terminales carecen de mitocondrias (Stowers et al., 2002; Gorska-Andrzejak et al., 2003). Milton colocaliza con mitocondrias pero no con otras organelas e interacciona indirectamente con kinesina-1. En mamíferos, los ortólogos de Milton, GRIF-1 (γ -aminobutyric acid type A receptor interacting factor-1) y OIP/Trak2 (β -O-linked N-acetylglucosamine transferase interacting protein), interactúan con KIF5C (Brickley et al., 2005; Smith et al., 2006), su sobreexpresión produce reordenamientos en la red mitocondrial (Koutsopoulos et al., 2011) y el silenciamiento de ambas altera el transporte mitocondrial (Brickley and Stephenson, 2011).

Miro, una Rho-like GTP-asa mitocondrial, es otra de las proteínas que está implicada en la regulación de la morfología y la distribución mitocondrial (Fransson et al., 2003; Frederick et al., 2004; Guo et al., 2005; Reis et al., 2009). La proteína Miro está localizada en la membrana mitocondrial externa y es requerida para la asociación de Milton y KIF5 con la mitocondria (Glater et al., 2006; MacAskill et al., 2009a). Mutaciones en el gen dMiro (*Drosophila* Miro) producen una disminución del transporte mitocondrial anterógrado evitando que las mitocondrias entren en los axones y sinapsis, y como consecuencia, alterando la liberación de los neurotransmisores y el amortiguamiento de calcio durante la estimulación prolongada (Guo et al., 2005) y variaciones en la expresión de esta proteína también producen una disminución del transporte retrógrado (Russo et al., 2009). Además de afectar transporte, el papel de Miro en los procesos de fusión y fisión también han sido sugeridos (Frederick et al., 2004; Fransson et al., 2006; Russo et al., 2009).

Otras proteínas también han sido identificadas como potenciales adaptadores del transporte mitocondrial. Una de ellas, la “fasciculation and elongation protein zeta-1” (FEZ1) (Kuroda et al., 1999), se ha mostrado como necesaria para el transporte anterógrado de las mitocondrias axonales en PC12 y neuronas hipocámpales (Fujita et al., 2007; Ikuta et al., 2007). Su ortólogo en *Caenorhabditis elegans*, UNC-76 es capaz de transportar organelas y vesículas a través de la asociación con el motor kinesina (Gindhart et al., 2003). Estudios posteriores muestran que la asociación de FEZ-1 con JIP1, una “c-Jun N-terminal kinase-interacting protein”, es capaz de activar la proteína motora kinesina (Blasius et al., 2007). De esta forma se ha propuesto que FEZ1 pueda actuar sobre el transporte mitocondrial regulando la actividad motora o estabilizando la unión motor-microtúbulo (Cai et al., 2011).

RanBP2 es otra de estas proteínas. RanBP2 es una gran proteína de anclaje asociada con el transporte núcleo-citoplasmático, la biogénesis de proteínas, la mitosis y el tráfico de organelas. RanBP2 interacciona directamente con KIF5B y KIF5C en cerebro y retina (Cho et al., 2007) y regula el transporte mitocondrial en células no neuronales (Cai et al., 2001), aunque poco es conocido acerca del posible papel que pueda tener esta proteína en el tráfico mitocondrial en células nerviosas (MacAskill and Kittler, 2010).

DISC1 (Disrupted in Schizophrenia-1) es una de las últimas proteínas descritas como modulador de la dinámica mitocondrial (Atkin et al., 2011). DISC1 es una proteína multicompartimentalizada que localiza predominantemente en la mitocondria (James et al., 2004) y que ha emergido como un gen de susceptibilidad a esquizofrenia (Ishizuka et al., 2006). DISC1 había sido establecido como regulador del transporte a través del citoesqueleto de microtúbulos (Taya et al., 2007) y la alteración de la morfología mitocondrial, debido a la sobreexpresión en células COS-7, también había sido descrita (Millar et al., 2005). Sin embargo, son recientes estudios los que demuestran un papel de esta proteína en el transporte mitocondrial (Atkin et al., 2011) donde la sobreexpresión y silenciamiento de esta proteína en cultivos de neuronas hipocampales producen un aumento o disminución, respectivamente, de la movilidad mitocondrial. Además de afectar el transporte mitocondrial, DISC1 también ha sido descrito como un regulador de la función mitocondrial a través de la regulación de Mitofilina (Park et al., 2010a). DISC1 ha sido identificado por su interacción con FEZ1 y se ha postulado un papel para estas proteínas en el crecimiento de las neuritas (Miyoshi et al., 2003; Kang et al., 2011) y en la formación de los circuitos neurales hipocampales (Honda et al., 2004) lo que podría hacer suponer que ambas proteínas regularían el transporte mitocondrial por un mecanismo común, aunque este no ha sido descrito.

La mayor parte de las mitocondrias permanecen estacionadas durante la mayor parte del tiempo. El principal objetivo del transporte mitocondrial es distribuir estas organelas en las áreas con alta demanda metabólica y de regulación de los niveles de calcio. Estas mitocondrias deberán detenerse y anclarse en el citoesqueleto en un proceso denominado “docking” mitocondrial. Recientes estudios identifican a sintafilina (SNPH) como este adaptador para el anclaje de las mitocondrias axonales (Kang et al., 2008). SNPH es una proteína específica de los axones neuronales y los ratones “knock-out” muestran una mayor movilidad mitocondrial respecto a sus controles. Además, recientemente se muestra que la cadena ligera de la dineína LC8, mediante su unión a SNPH, aumenta la interacción con los microtúbulos, regulando así el proceso de docking mitocondrial (Chen et al., 2009).

1.2.2.- A través de los filamentos de actina

El citoesqueleto de actina está relativamente enriquecido en los compartimentos celulares que son esenciales para la función sináptica, tales como los terminales presinápticos

y las espinas dendríticas. Esta claro que la mayoría del flujo mitocondrial en los axones es generado por los movimientos basados en los microtúbulos. Sin embargo, el papel que desempeñan los filamentos de actina y las miosinas en el transporte de las mitocondrias no ha sido tan bien caracterizado (Morris and Hollenbeck, 1995; Ligon and Steward, 2000; Hollenbeck and Saxton, 2005; Cai and Sheng, 2009a).

Uno de los posibles roles para el transporte basado en actomiosina, consiste en aumentar o suplementar el movimiento basado en los microtúbulos, devolviendo las mitocondrias que se han soltado de nuevo a estos filamentos o ocupándose del movimiento en aquellas regiones que están empobrecidas en microtúbulos. Así, en neuronas, se propuso un modelo dual de transporte, en el que los motores que usan los microtúbulos aseguraban un transporte axonal de largo alcance, mientras que el movimiento de corto alcance de las vesículas y organelas en los terminales nerviosos y conos de crecimiento dependía fundamentalmente de los motores que usan los filamentos de actina (Langford, 2002).

Sin embargo, también ha sido propuesta una alternativa en la que, los movimientos basados en miosina de las mitocondrias realmente contribuyen a su distribución, oponiéndose a los movimientos basados en los microtúbulos (Pathak et al., 2010). De esta forma, se ha sugerido que la mayoría del transporte mitocondrial sería debido a los microtúbulos, mientras que las miosinas, interaccionarían con la actina para oponerse al movimiento de manera transitoria pero que se convertiría en estable en presencia de determinadas señales o de proteínas de docking adicionales.

Con la excepción de la miosina V y VI poco es conocido acerca del papel de las miosinas en el transporte axonal mitocondrial (Hollenbeck, 1996; Bridgman, 2004; Pathak et al., 2010). En este último estudio, depleciones de las miosinas V y VI demuestran una relación directa con las mitocondrias, y en el que se observa un incremento en el movimiento anterógrado (para miosina V) y retrógrado (para ambas).

De forma paralela (Quintero et al., 2009) también han demostrado la asociación de la miosina XIX (Myo19), que forma parte de una nueva clase de miosinas, con la mitocondria. La función de Myo19 es investigada usando experimentos de sobreexpresión en células epiteliales y que parecen liberar a la mitocondria, causando un substancial incremento en su movimiento y que hacen aventurar un papel relevante de Myo19 en el transporte mitocondrial basado en actina (Titus, 2009).

1.2.3.- Regulación del transporte y distribución

La regulación del transporte y de la distribución mitocondrial, especialmente en las neuronas, permite que estos orgánulos se acumulen en regiones celulares que presentan una alta tasa de consumo de energía. De esta forma, las mitocondrias de los somas neuronales, serán transportadas a lo largo de los procesos en respuesta a cambios del estado energético

local y de la demanda metabólica (Hollenbeck, 1996).

Algunos estudios postulan que la dirección del transporte mitocondrial esta fuertemente relacionada con el potencial de membrana mitocondrial. Las mitocondrias que se desplazan en sentido anterógrado poseen un potencial de membrana más alto, mientras aquellas con menor potencial de membrana son transportadas hacia el cuerpo celular, sugiriendo que el movimiento anterógrado transportaría las mitocondrias a los sitios de acción de las neuronas, mientras que el movimiento retrógrado las transportaría al cuerpo celular, para su degradación y reciclaje (Miller and Sheetz, 2004). Así, la fisión mitocondrial generaría mitocondrias sanas que serían transportadas a lo largo de los axones hacia la región más distal o las sinapsis, mientras que las mitocondrias con un mal funcionamiento viajarían hacia el soma y serían reparadas, ya sea por fusión con mitocondrias sanas o degradadas a través de mitofagia (Chang and Reynolds, 2006b; Rintoul and Reynolds, 2010). Sin embargo, recientes estudios han demostrado que las mitocondrias móviles, tanto en sentido anterógrado como retrógrado, así como las estacionarias no presentan diferencias en el potencial de membrana (Verburg and Hollenbeck, 2008).

Por una parte, el transporte mitocondrial en las neuronas está regulado de forma dependiente de actividad, debido a variaciones en los niveles intracelulares de calcio y a la disponibilidad de ATP (Yi et al., 2004). Por otra parte, también está descrito que las mitocondrias son transportadas hacia axones en crecimiento y reclutadas en zonas concretas del cono axonal de neuronas en cultivos, donde permanecerán estacionadas, mientras que, su movimiento retrógrado aumentaría o la densidad mitocondrial sería significativamente reducida, durante la supresión del crecimiento axonal (Morris and Hollenbeck, 1993; Ruthel and Hollenbeck, 2003). Asimismo, en las neuronas en desarrollo de las larvas de mosca, las mitocondrias exhiben un mayor movimiento anterógrado y una mayor densidad a lo largo del axón (Pilling et al., 2006; O'Toole et al., 2008).

Las mitocondrias son las responsables de regular los niveles intracelulares de calcio. Ellas proveen de ATP a las bombas de calcio distribuidas a lo largo de la membrana plasmática además de secuestrar el exceso de calcio citosólico en las terminales presinápticas y en las espinas dendríticas postsinápticas.

La movilidad mitocondrial decrece después de una despolarización inducida por KCl (Li et al., 2004b) o de la entrada de calcio mediada por los receptores de NMDA (Rintoul et al., 2003) y la duración del incremento de los niveles de calcio intracelular, corresponde al grado de reducción del transporte mitocondrial (Mironov, 2006). Contrariamente, la movilidad en cultivos neuronales se incrementa después de una aplicación de tetrodotoxina (Li et al., 2004b). De forma paralela, la bajada de ATP después de la aplicación de glutamato, reduce la velocidad mitocondrial. Además, niveles elevados de ADP, debido a un incremento en el consumo de ATP, reclutan las mitocondrias hacia las sinapsis (Mironov, 2007; Mironov, 2009).

Recientemente, los mecanismos por los cuales una mitocondria móvil transita hacia un estado estacionario han sido descritos a través del complejo KIF5-Milton-Miro (Saotome et al., 2008; Cai and Sheng, 2009b; MacAskill et al., 2009b; Wang and Schwarz, 2009). Estos estudios revelan como los niveles de calcio intracelular regulan la movilidad mitocondrial al producirse la parada de estos orgánulos cuando la proteína Miro, a través de sus dominios “EF-hands”, se une a calcio, actuando así como un “sensor de calcio”. Así, el reclutamiento de las mitocondrias sinápticas, por la activación de los receptores de glutamato o de un estímulo eléctrico que provoque potenciales de acción, ocurre a través de este complejo y, por ejemplo, la expresión en neuronas de un mutante de Miro con las “EF-hands”, incapaz de unirse a calcio, bloquea esta reducción en la velocidad mitocondrial.

Pese a estos avances, el preciso mecanismo de este proceso no ha sido aclarado y dos modelos han sido propuestos. Un primer modelo (Figura 3A), posiciona que Miro sirve como una proteína adaptadora que une indirectamente la mitocondria y KIF5 (MacAskill et al., 2009b). En este escenario, la unión de calcio libera el enlace entre Miro y KIF5. En cambio, el modelo intercambio motor-adaptador (Wang and Schwarz, 2009) (Figura 3B) propone que en ausencia de Calcio, la cola C-terminal de KIF5 se une a mitocondrias mediante la interacción con el complejo Milton-Miro, mientras que el dominio motor N-terminal es libre de dirigir el transporte anterógrado a través de los microtúbulos. Un cambio conformacional debido a la unión de calcio con los “EF-hands” de Miro, resulta en una unión directa entre el dominio

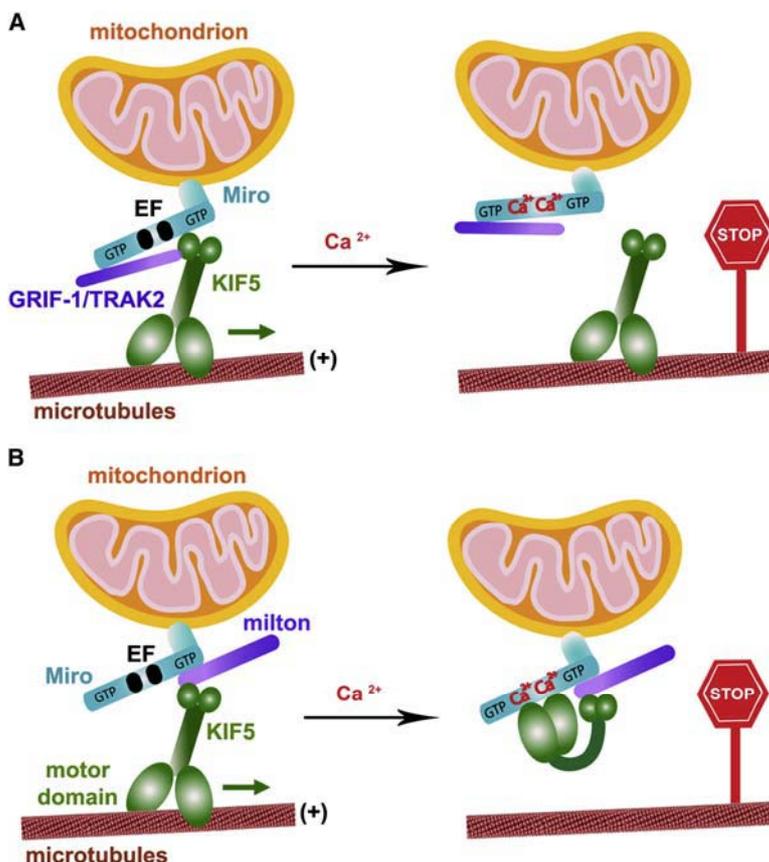


Figura 3: **Modelos esquemáticos de Miro como “sensor de calcio” en la regulación de la movilidad mitocondrial** (Cai & Sheng 2009b). (A) La unión de calcio a los “EF-hands” disocia Miro de KIF5 mientras que GRIF-1/TRAK2 (los homólogos en mamíferos de Milton) permanecen unidos a Miro1 (MacAskill et al., 2009a; MacAskill et al., 2009b). (B) La cola de KIF5 esta unida a Miro vía Milton de manera calcio independiente, dejando al dominio motor unirse a los microtúbulos. Tras la unión de calcio con los “EF-hands” se produce la interacción directa del dominio motor con Miro, previniendo su ensamblaje con los microtúbulos (Wang and Schwarz, 2009). Adaptación: (Cai and Sheng, 2009a).

motor de KIF5 y Miro, lo que impide la unión KIF5-microtúbulos necesaria para el transporte.

Además de la regulación a través de la actividad y calcio, existen otras vías de señalización que regulan la distribución mitocondrial. Recientemente, la caracterización de la interacción de la N-acetilglucosamina transferasa con el complejo Miro/Milton sugiere que este complejo puede ser regulado por O-glucosilación (Brickley et al., 2011). Son más los estudios que refuerzan el papel de GSK3 β (glycogen synthase kinase) como un regulador clave del transporte mitocondrial. Se ha demostrado que GSK3 β fosforila la proteína motora kinesina-1 (en concreto la cadena ligera KLC2) disminuyendo el transporte axonal rápido (Morfini et al., 2002). Esta misma cadena ya había sido asociada con mitocondrias en cultivos celulares (Khodjakov et al., 1998).

La sobreexpresión en cultivos neuronales de GSK3 β , o del activador de la kinasa dependiente de ciclina (cdk5) p25, proteínas que han sido implicadas en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad del Alzheimer (Cruz and Tsai, 2004; Hooper et al., 2008), reducen el movimiento mitocondrial mediante el incremento de los periodos de pausa y una disminución del transporte anterógrado, sin afectar sus velocidades intrínsecas (Morel et al., 2010). En este mismo sentido la proteína beta-amiloide produce un decremento del transporte mitocondrial que se ve atenuado por la activación de la proteína kinasa A (PKA) o por la inhibición de GSK3 β (Rui et al., 2006), aunque en este último estudio la sola inhibición de GSK3 β no sería suficiente para alterar el porcentaje de mitocondrias móviles en las condiciones control.

La Serotonina también ha sido descrita como promotora del transporte axonal de las mitocondrias, actuando a través del receptor 5-HT_{1A}, mediante el incremento de la actividad de Akt y, consecuentemente, reduciendo la actividad de GSK3 β (Chen et al., 2007b). En este caso, la reducción de la actividad de GSK3 β , produciría una inhibición de la histona deacetilasa HDAC6, incrementando los niveles de tubulina acetilada y de esta forma aumentando el movimiento mitocondrial (Chen et al., 2010b). En contraste, la dopamina inhibe la movilidad mitocondrial en cultivos neuronales de hipocampo a través de la misma cascada de señalización (Chen et al., 2008).

El transporte mitocondrial también puede ser regulado de manera local a través de la señalización del factor de crecimiento nervioso (NGF) o de semaforinas. NGF funciona como una señal de parada inmovilizando las mitocondrias axonales en neuronas sensoriales de pollo, provocando su acumulación en la región de contacto de microesferas recubiertas con este factor (Chada and Hollenbeck, 2003). Este proceso de “docking” está probablemente basado en los filamentos de actina, de manera dependiente de TrkA y de la activación de PI3-kinasa (Chada and Hollenbeck, 2004; Reynolds and Rintoul, 2004).

Conjuntamente, los datos hasta ahora expuestos concluyen que el citoesqueleto de

microtúbulos permitiría el transporte rápido y a largas distancias de las mitocondrias anterógradamente hacia sus lugares de acción en regiones distales del axón y dendritas ó retrógradamente hacia el soma neuronal para su reciclaje o degradación. El citoesqueleto de actina, en cambio, actuaría como un soporte perfecto para regular el posicionamiento y retención de las mitocondrias una vez estas ya están en sus regiones de acción, pudiéndose regular la distribución local de las mitocondrias con movimientos cortos y lentos para una mayor eficacia de su función. Todos estos mecanismos serían a la vez regulados por vías de señalización que trabajarían de manera integrada con otros procesos celulares.

1.3.- Mecanismos de fusión/fisión mitocondrial

Para asegurar la eficiencia en la función y la salud de las mitocondrias estas deben de mantenerse en óptimas condiciones. Como parte de este proceso, las mitocondrias son organelas altamente dinámicas que pueden fusionarse y dividirse en respuesta a estímulos extracelulares, del estado de desarrollo y de los requerimientos energéticos de la célula (Chan, 2006b; Chang and Reynolds, 2006a; Cervený et al., 2007; de Brito and Scorrano, 2008b; Otera and Mihara, 2010; Palmer et al., 2011b). En la mayoría de las células, las mitocondrias forman una red reticular que irradia desde el núcleo, creando un sistema interconectado que supe a la célula con la energía y metabolitos necesarios. (Westermann, 2008; Liesa et al., 2009). Variaciones en la morfología mitocondrial corresponden al flujo entre dos estados extremos: una red reticular de mitocondrias fusionadas y una distribución fragmentada (Figura 4A)(Bereiter-Hahn and Voth, 1994). Estos eventos están controlados por la regulación de proteínas envueltas en fisión y fusión y el mantenimiento de la distribución mitocondrial (Figura 4B).

En neuronas, los procesos de fusión y fisión mitocondrial tiene un papel relevante y mutaciones en las proteínas que median estos procesos han sido identificadas en enfermedades neurodegenerativas (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000; Zuchner et al., 2004), mientras que otras proteínas que regulan la dinámica mitocondrial han sido implicadas en desordenes neurológicos incluyendo las enfermedades de Huntigton, Alzheimer y Parkinson (Wang et al., 2009b; Manczak et al., 2011; Song et al., 2011; Wang et al., 2011a).

1.3.1.- Fusión Mitocondrial

La fusión mitocondrial es un mecanismo por el cual la población de organelas se mantiene homogénea, mezclando y unificando el compartimento mitocondrial, y facilita la inter-complementación del mtDNA (Chen et al., 2005b; Chen et al., 2010a; Zorzano et al., 2010). Las grandes redes mitocondriales son frecuentemente encontradas en células metabólicamente activas. Consisten en filamentos mitocondriales interconectados y extendidos y actúan como sistemas eléctricamente unidos. Estas redes son capaces de

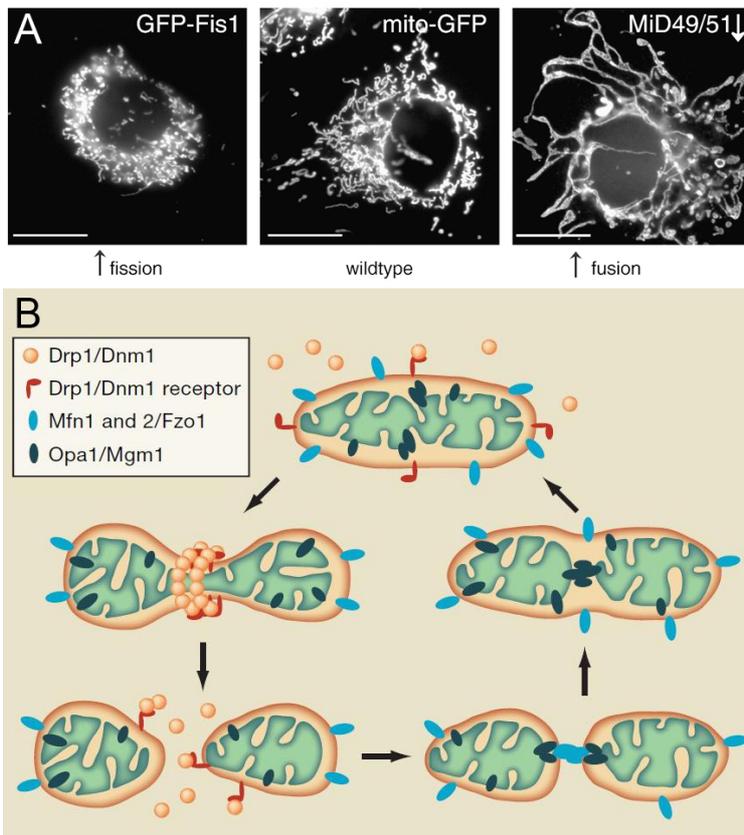


Figura 4: **El balance entre la fisión y la fusión regula la morfología mitocondrial.** Las mitocondrias típicamente forman una red reticular que es mantenida en coordinación de la maquinaria de fusión y fisión. **(A)** La sobreexpresión del mediador de la fisión GFP-Fis1 en células COS7 causa una fragmentación mitocondrial (izquierda) comparada con el fenotipo “wild type” (centro). La pérdida de los mediadores de la fisión MiD49 y MiD51 resulta en una desregulación de la fisión mitocondrial y un exceso de fusión (derecha). Las células fueron co-transfectadas con mito-GFP para visualizar las mitocondrias. Adaptación: (Palmer et al., 2011b). **(B)** Representación esquemática del ciclo de fusión/fisión. Adaptación: (Tamura et al., 2011).

fisión de la membrana mitocondrial (Okamoto and Shaw, 2005; Hoppins et al., 2007; Merz et al., 2007; Westermann, 2010a). En mamíferos, mucha de la maquinaria de fusión y fisión mitocondrial permanece conservada (Chen and Chan, 2004) (Tabla 1).

Las mitofusinas (Mfn) (Figura 5A) son grandes y conservadas GTPasas localizadas en la membrana mitocondrial externa (Santel and Fuller, 2001; Rojo et al., 2002; Chen et al., 2003). En mamíferos hay dos homólogos de Fzo altamente relacionados, Mfn1 y Mfn2, y la pérdida de su función produce la fragmentación de la red mitocondrial (Chen et al., 2003; Chen et al., 2005b). La topología de estas proteínas en la membrana mitocondrial las hace buenos candidatos para estar implicadas en la fusión de la membrana externa. Tanto el extremo N- y C-terminal están expuestos desde la membrana externa hacia el citosol,

transmitir el potencial de membrana mitocondrial desde las zonas ricas en oxígeno a las pobres y, de esta forma, permitiendo una disipación eficiente de la energía en la célula (Skulachev, 2001).

Estudios de genética molecular permitieron la identificación de la maquinaria responsable de la fusión y fisión mitocondrial. Fue la identificación del gen de *Drosophila*, fuzzy onions (Fzo), en la fusión mitocondrial del esperma (Hales and Fuller, 1997) el que permitió rápidos avances en el conocimiento de la maquinaria de la dinámica mitocondrial. La similitud en la función de esta proteína con su homólogo en levadura, Fzo1 (Hermann et al., 1998; Rapaport et al., 1998), permitió que este organismo emergiera como uno de los modelos más importantes en el estudio de los mecanismos moleculares de la fusión y

implicando una topología en forma de “U” (Rojo et al., 2002; Santel et al., 2003). Se ha sugerido que las mitofusinas facilitan el anclaje de las membranas, similar a la acción de los SNAREs, formando complejos homo y hetero-oligoméricos de Mfn1 y Mfn2 a través de la interacción de sus dominios de hélice superenrollada de manera GTP dependiente (Ishihara et al., 2004; Koshiba et al., 2004; Chen et al., 2005b; Detmer and Chan, 2007).

Proceso	Levadura	Ortólogos en eucariotas superiores	Localización	Función propuesta
Fusión	Fzo1	Mfn1 y Mfn2 (mamíferos) Fzo y Dmfn (<i>D. melanogaster</i>)	ME	Fusión de la ME
	Ugo1	-	ME	Coordinación de la fusión de la ME y la MI
	Mgm1	OPA1 (mamíferos)	MI y EIM	Fusión de la MI
Fisión	Dnm1	DRP1/DLP1 (mamíferos) Drp1 (<i>C. Elegans</i>) ADL1 y ADL2 (<i>A. thaliana</i>)	Citosol y ME	
	Fis1	hFis1 (humanos)	ME	Receptor para la maquinaria de fisión de la ME
	Mdv1	-	Citosol y ME	Adaptador entre Fis1 y Dnm1
	Caf4	-	Citosol y ME	Redundante con Mdv1

Tabla 1: **Componentes centrales de las maquinarias de fusión y fisión mitocondrial.** Abreviaturas: EIM, espacio intermembrana; ME, membrana externa; MI, membrana interna. Adaptación: (Westermann, 2008).

A pesar de que ambas mitofusinas pueden facilitar la fusión de la membrana mitocondrial externa, un gran número de evidencias sugieren que pueden compartir papeles complementarios y dispares en la fusión mitocondrial (Palmer et al., 2011b). Ambas mitofusinas pueden remplazarse funcionalmente, pero en fibroblastos es Mfn1 la que participa de forma más activa (Chen et al., 2005b). Mfn1 y Mfn2 knockouts exhiben letalidad embrionaria, con Mfn2 presentando defectos en las células placentarias gigantes al contrario que Mfn1 (Chen et al., 2003), aunque puede ser consecuencia de los niveles de expresión relativa en los diferentes tejidos (Chan, 2006b). La función de OPA1 muestra dependencia de Mfn1 pero no de Mfn2 (Cipolat et al., 2004) y Mfn1 muestra mayor actividad en un ensayo de anclaje mitocondrial (Ishihara et al., 2004). Además, Mfn2 está enriquecida en la interfaz entre el retículo endoplasmático (RE) y la mitocondria, y el silenciamiento de Mfn2 afecta a ambas morfologías, la de la mitocondria y del RE (de Brito and Scorrano, 2008a; Merkwirth and Langer, 2008). En el sistema nervioso también se han observado diferencias en la función de los dos tipos de mitofusinas. La falta de Mfn2, pero no Mfn1, en el cerebelo exhibe una reducción en el crecimiento dendrítico y la formación de espinas en las células de Purkinje y una disminución de la supervivencia celular (Chen et al., 2007a), también Mfn2 se ha visto

como protector de la viabilidad de las neuronas granulares del cerebelo frente a la liberación de citocromo c (Jahani-Asl et al., 2007) y, mientras que mutaciones en el gen que codifica para Mfn2 se ha demostrado que causan la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A (CMT2A), ningún paciente ha sido reportado en el caso de Mfn1 (Zuchner et al., 2004).

Otra de las proteínas implicadas en la fusión mitocondrial es OPA1 (Figura 5B), Mgm1 en levaduras, que fue inicialmente identificado como un gen mutado en la atrofia óptica autosómica dominante (DOA) (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000; Davies et al., 2007). OPA1 es una GTPasa similar a dinamina, asociada con la membrana mitocondrial interna y con el espacio intermembrana, e implicada en el mantenimiento de la remodelación de las crestas mitocondriales y de la fusión de la membrana interna (Wong et al., 2000; Olichon et al., 2002; Herlan et al., 2003; Satoh et al., 2003; Griparic et al., 2004). OPA1 es procesada en 8 diferentes isoformas y cambios en el balance entre las formas largas (“L”) y cortas (“S”) afectan a la fusión de las mitocondrias (Ishihara et al., 2006). Como las mitofusinas, OPA1 es esencial para la fusión mitocondrial y su silenciamiento produce un aumento de la fragmentación mitocondrial (Cipolat et al., 2004; Griparic et al., 2004; Chen et al., 2005b) y aberraciones en la estructura de las crestas (Olichon et al., 2002; Griparic et al., 2004).

Componentes adicionales han sido identificados como importantes para los procesos de fusión mitocondrial, como es el caso de la proteína Prohibitin2 y SLP2 (stomatin like protein-2) (Figura 5B). Se ha propuesto que ambas proteínas actuaran como intermediarios de la función de OPA1 (Merkwirth et al., 2008; Tondera et al., 2009). Además, se ha demostrado la interacción de SLP2 con la prohibitinas (Da Cruz et al., 2008) y Mfn2 (Hajek et al., 2007), lo que podría indicar que podría coordinar directamente la fusión de las membranas interna y externa después de un estímulo de estrés (Palmer et al., 2011b). En levaduras, la proteína de la membrana mitocondrial externa Ugo1 ha sido identificada por su papel en la fusión mitocondrial (Sesaki and Jensen, 2001; Hoppins et al., 2009), sin embargo, ningún homólogo en mamíferos ha sido descrito hasta la actualidad.

A través de la regulación sobre las proteínas implicadas en los procesos de fusión y fisión mitocondrial, se han descrito un número importante de proteínas que modulan la morfología mitocondrial, entre estados de fusión completa o transitoria (Liu et al., 2009). MIB (Mitofusin binding protein) es una de estas proteínas, que se ha postulado regula negativamente la actividad de mitofusina 1 (Eura et al., 2006). La sobreexpresión de MIB produce la fragmentación de las mitocondrias mientras que su silenciamiento produce fusión. Además, la interacción de MIB con mitofusina 1 y 2 también ha sido demostrada (Eura et al., 2006) (Figura 5A). Mdm30 es otra proteína encargada de regular la fusión mitocondrial en levaduras, a través de la ubiquitinización de Fzo1 y consecuente degradación por el proteosoma (Escobar-Henriques et al., 2006; Cohen et al., 2008; Cohen et al., 2011), aunque de momento ningún homólogo en mamíferos ha sido descrito. Por otra parte, el

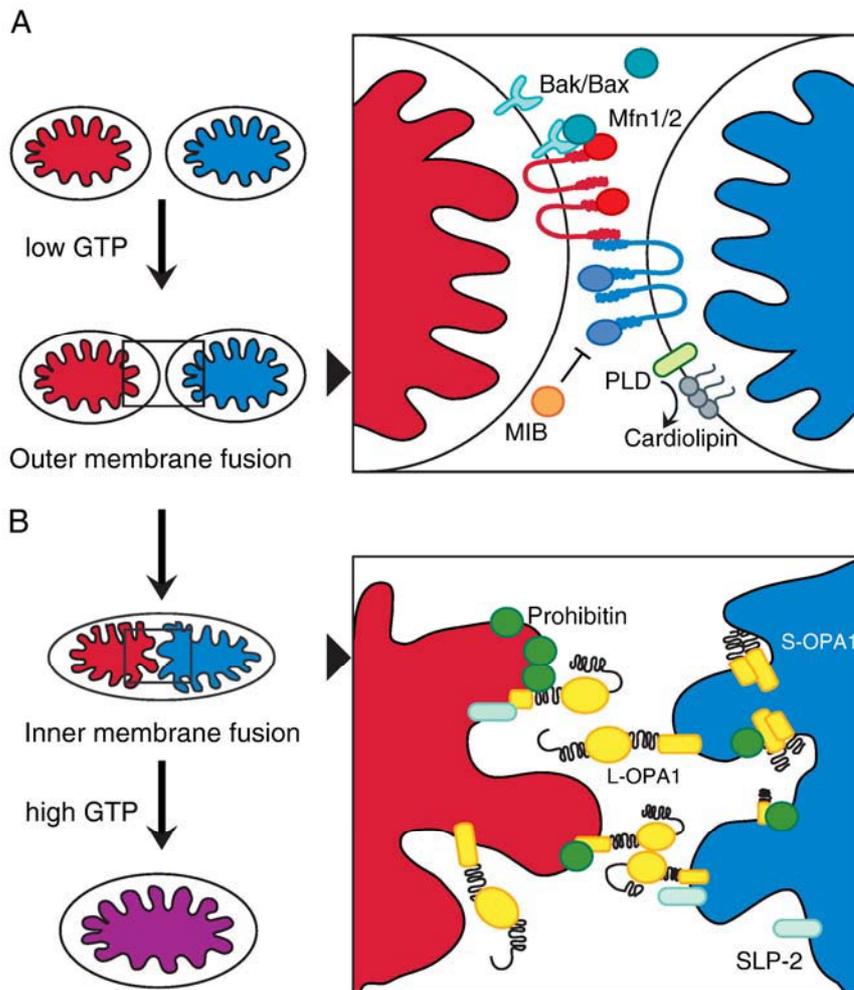


Figura 5: **Coordinación de la fusión mitocondrial en mamíferos.** (A) La fusión de la membrana externa esta mediada por Mfn1 y Mfn2. Mfn 1/2 homo y heterodímeros interactúan en "trans" y forman un complejo de anclaje de la organela. La proteína MIB (mitofusina binding protein) regula negativamente la fusión mitocondrial mediante su interacción con Mfn 1/2. La fosfolipasa mitocondrial D (mitoPLD) facilita la fusión mediante la hidrólisis de cardiolipina para producir ácido fosfatídico y consecuentemente alterar la curvatura de la membrana. Bax/Bak afectan la fusión a través de su interacción con Mfn 1/2 en respuesta a señales celulares. (B) La fusión de la membrana interna está gobernada por OPA1. Con la presencia de GTP, las isoformas de OPA1 oligomerizan dando lugar a la fusión de la membrana interna. El balance entre las isoformas de OPA1 afecta a la estabilidad mitocondrial y la remodelación de la membrana interna. OPA1 es estabilizada por la unión de proteínas intermediarias como Prohibitin 2 y SLP-2. Adaptación: (Palmer et al., 2011b).

silenciamiento de la subunidad $G\beta 2$, que se encuentra enriquecida en la membrana externa interactuando con Mfn1 y regulando su movilidad, produce un aumento en la fragmentación mitocondrial por lo que se ha postulado su papel regulando la fusión (Zhang et al., 2010b).

La fusión mitocondrial también requiere de una remodelación de la membrana lipídica (Wickner and Schekman, 2008; Furt and Moreau, 2009).

MitoPLD (mitochondrial phospholipase D) promueve la fusión mitocondrial a través de la hidrólisis de la cardiolipina a ácido fosfatídico (PA) en la membrana externa, que facilita la fusión mediada por

mitofusinas (Choi et al., 2006). Este aumento de PA, conlleva al reclutamiento de la fosfatasa Lipin1 (Figura 5A), que convierte el PA en DAG y promueve fusión mitocondrial sugiriendo un mecanismo para la homeostasis de la morfología mitocondrial (Huang and Frohman, 2009; Huang et al., 2011).

Existen también una serie de procesos biológicos en el interior de la célula que conllevan una alteración del tamaño mitocondrial. Uno de los más importantes es el proceso

de apoptosis, que conlleva a una extensiva fragmentación mitocondrial y a una permeabilización de la membrana externa, en el que proteínas de la maquinaria de fusión y fisión mitocondrial están directamente implicadas (Li et al., 1997; Frank et al., 2001; Karbowski and Youle, 2003; Lee et al., 2004). Recientes estudios han revelado que proteína pro-apoptóticas como Bax y Bak inducen fisión mitocondrial de manera separada de la liberación del citocromo c (Sheridan et al., 2008). Tanto Bak como Bax han sido asociados con mitofusinas, Mfn1 y 2 en el caso de Bak (Brooks and Dong, 2007; Brooks et al., 2007) y Mfn2 con Bax (Karbowski et al., 2006; Hoppins et al., 2011) (Figura 5A). En ausencia de estas 2 proteínas pro-apoptóticas, la distribución de Mfn2 esta alterada y no se forman focos de fusión en la membrana mitocondrial externa, lo cual sugiere que la expresión de Bax y Bak afecta la movilidad de Mfn2 y que perfilan un papel de estas proteínas en la regulación de la fusión mitocondrial en condiciones normales o apoptóticas (Karbowski et al., 2006).

El balance entre las isoformas de OPA1 es otro de los mecanismos implicados en la regulación de la fusión mitocondrial y de la apoptosis. El incremento en el procesamiento de OPA1, conlleva a mayores niveles de las isoformas solubles S-OPA1, que ocurren tras una pérdida del potencial de membrana, de mtDNA y/o una inducción de la apoptosis, resultando en una excesiva fragmentación mitocondrial y disrupción de las crestas (Duvezin-Caubet et al., 2006; Frezza et al., 2006; Ishihara et al., 2006; Song et al., 2007). Este proceso se produce por el procesamiento proteolítico específico mediante la actividad de proteasas mitocondriales como PARL (prsenilin associated rhomboid-like protease) (Herlan et al., 2003; Cipolat et al., 2006; Pellegrini and Scorrano, 2007), AFG3L1/2 y paraplegin (Ishihara et al., 2006), OMA1 (Ehse et al., 2009) e Yme1 (Griparic et al., 2007; Song et al., 2007).

Los niveles de potencial de membrana mitocondrial son otro de los factores que regulan los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Mientras que las mitocondrias son transportadas en sentido anterógrado o retrógrado de manera independiente al potencial de membrana (Verburg and Hollenbeck, 2008), este resulta crucial en la regulación de la morfología mitocondrial (Legros et al., 2002; Ishihara et al., 2003; Mattenberger et al., 2003). La pérdida de potencial de membrana causada por ionóforos, resulta en una inhibición de la fusión, que conlleva a una mayor fragmentación de la red mitocondrial y que es reversible tras la retirada de los ionóforos (Legros et al., 2002; Ishihara et al., 2003). OPA1 es uno de las proteínas que se ha visto regulada por los niveles de potencial de membrana, dándose un aumento de las isoformas solubles de esta proteína tras una pérdida de potencial (Song et al., 2007; Guillery et al., 2008b).

1.3.2.- Fisión Mitocondrial

Al igual que la fusión, la fisión mitocondrial juega un papel fundamental en la célula. Debido a que las mitocondrias se propagan por crecimiento y posterior división a partir de

organelas preexistentes, la herencia de las mitocondrias depende de la fisión durante el proceso de citokinesis (Yaffe, 1999b) que asegurará la correcta segregación de las copias de mtDNA a las mitocondrias hijas (Legros et al., 2004). Además, la fisión mitocondrial es importante en varios procesos de diferenciación incluyendo la formación de sinapsis y espinas dendríticas en neuronas (Li et al., 2004b). Un incremento o desregulación de la fisión mitocondrial puede causar una población heterogénea de organelas con una distribución de mtDNA no uniforme, una capacidad de generar ATP variable, un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y de la susceptibilidad de las células para sufrir apoptosis (James et al., 2003; Parone et al., 2008).

Estudios realizados en levaduras y *C. elegans* permitieron identificar los componentes de la maquinaria de fisión mitocondrial en mamíferos (Gammie et al., 1995; Mozdy et al., 2000). Uno de estos componentes, Drp1 (Dynamin-Related Protein 1) (Figura 6), contiene varios dominios similares a la familia de las dinaminas GTPasas, incluyendo un dominio GTPasa y un dominio efector de GTPasa (GED) (Otsuga et al., 1998; Smirnova et al., 1998). Drp1 es una proteína predominantemente citosólica que se acumula en los sitios de fisión mitocondrial formando complejos multiméricos en forma de anillo que facilitarían la escisión de la doble membrana tras la hidrólisis de GTP (Bleazard et al., 1999; Labrousse et al., 1999; Mozdy et al., 2000; Smirnova et al., 2001; Legesse-Miller et al., 2003; Ingerman et al., 2005; Lackner et al., 2009; Lackner and Nunnari, 2009; Mears et al., 2011). La inhibición de Drp1 por la expresión de un dominante negativo o por RNA de interferencia, conlleva a un incremento de la longitud, la interconectividad de los túbulos mitocondriales y una agregación perinuclear debido al aumento de la fusión (Smirnova et al., 2001; Lee et al., 2004). Recientes estudios también han demostrado que Drp1 desarrolla un papel crucial en el mantenimiento de la morfología y dinámicas mitocondriales. El ratón “knockout” de Drp1 presenta una letalidad embrionaria, con los embriones mostrando un hígado y estructuras cardíacas poco desarrolladas, un incremento en la apoptosis en el córtex neural profundo y la formación de sinapsis comprometida (Ishihara et al., 2009; Wakabayashi et al., 2009).

Receptores de membrana son necesarios para el reclutamiento de Drp1 en la membrana mitocondrial externa (Mozdy et al., 2000; Otera et al., 2010; Palmer et al., 2011a) pero poco es conocido acerca del mecanismo de acción. Fis1 es una pequeña proteína que se encuentra localizada uniformemente a lo largo de la membrana mitocondrial externa (Suzuki et al., 2003; Dohm et al., 2004; Suzuki et al., 2005) (Figura 6). Por analogía con Dnm1 de levaduras (Mozdy et al., 2000; Karren et al., 2005; Zhang and Chan, 2007), sería esperable que Drp1 localizara en la mitocondria de forma dependiente de Fis1, sin embargo, un eficiente knockdown de Fis1 no afecta al reclutamiento de Drp1 (Lee et al., 2004; Wasiak et al., 2007). La sobreexpresión de Fis1 produce un aumento de la fragmentación mitocondrial de forma dependiente de Drp1 (James et al., 2003; Yoon et al., 2003; Stojanovski et al., 2004) mientras que el knockdown produce la elongación de los túbulos mitocondriales (Lee et al.,

2004; Stojanovski et al., 2004). Sin embargo, recientes ensayos de silenciamiento de Fis1 en células de mamífero, han encontrado tan sólo un pequeño efecto en la morfología mitocondrial y ha sido propuesto que las observaciones previas usando RNA de interferencia fueron debidas a efectos “off-target” del silenciamiento de Fis1 (Otera et al., 2010), por lo que el papel concreto de Fis1 todavía debe ser aclarado.

Otras proteínas han sido sugeridas por su papel en el reclutamiento de Drp1, estas son Mff (mitochondrial fission factor) y las proteínas MiD49 y Mid51 (mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 Kda) (Figura 6). La sobreexpresión de Mff aumenta la fisión mitocondrial y la translocación del pool citosólico de Drp1 a la mitocondria, al contrario que su silenciamiento, que conlleva a la elongación de las mitocondrias y a la reducción de Drp1 en su superficie, habiéndosele atribuido un papel en fisión mitocondrial independiente de Fis1 (Gandre-Babbe and van der Bliëk, 2008; Otera et al., 2010; Otera and Mihara, 2011). La sobreexpresión y silenciamiento de MiD51 y MiD49 producen diferentes formas morfológicas de mitocondrias fusionadas y, al igual que Mff, la sobreexpresión conlleva a una translocación de pool citosólico de Drp1 a la superficie mitocondrial (Palmer et al., 2011a; Zhao et al., 2011), sin embargo los mecanismos precisos a través de los cuales actúan estas

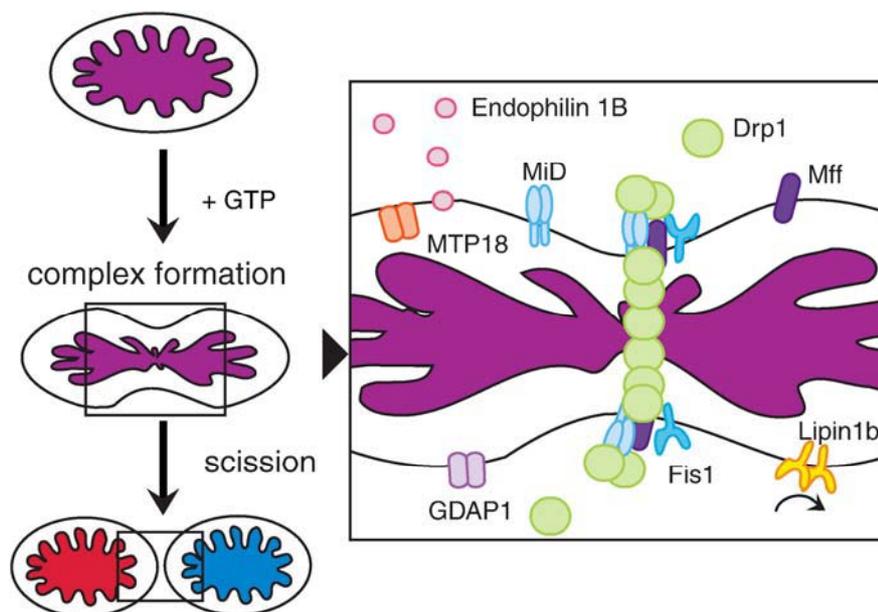


Figura 6: **Fisión mitocondrial en mamíferos.** La división mitocondrial ocurre cuando la proteína citosólica Drp1 es reclutada en la membrana mitocondrial externa, resultando en una constricción de la organela. Fis1, Mff y las proteínas MiD49/51 han sido postuladas como participantes en el proceso de reclutamiento y ensamblaje de Drp1 en la membrana mitocondrial externa. En presencia de GTP, Drp1 forma anillos concéntricos alrededor del sitio de escisión y la hidrólisis de GTP la constricción de estos complejos facilitando la escisión de la mitocondria. Otras proteínas implicadas en la fisión mitocondrial incluyen Endophilin B1 que se cree modula la curvatura de la membrana, y Lipin 1b que convierte el ácido fosfatídico en diacylglycerol (DAG). MTP18 y GDAP1 también han sido propuestas por participar en la fisión mitocondrial. Adaptación: (Palmer et al., 2011b).

proteínas todavía deben de ser establecidos.

Más proteínas que han sido implicadas en fisión mitocondrial son: MTP18 (mitochondrial protein 18Kda) (Figura 6), localizada en la membrana mitocondrial interna y cuya sobreexpresión en cultivos celulares produce un aumento de mitocondrias fragmentadas de forma dependiente de Drp1 mientras que su silenciamiento conlleva a fusión mitocondrial y liberación del citocromo c (Tondera et

al., 2005); GDAP1 (Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1) (Figura 6) que esta localizada en la membrana mitocondrial externa y su sobreexpresión causa la fragmentación de las mitocondrias, y su silenciamiento, por el contrario, provoca una fusión de la red mitocondrial (Niemann et al., 2005) y Endophilin B1 que es una proteína citosólica con una porción asociada con mitocondrias, de forma similar a la distribución de Drp1, y se ha propuesto que actuaría por debajo de la actividad de Drp1 durante la fisión mitocondrial, a través de la remodelación de los lípidos de la membrana mitocondrial externa (Karbowski et al., 2004b).

Se han descrito una serie de mecanismos que regulan la fisión mitocondrial en respuesta a una variedad de eventos celulares incluyendo división celular, diferenciación y apoptosis. Muchos de estos procesos confluyen en varias modificaciones postraduccionales sobre Drp1 (Cervený et al., 2007; Han et al., 2010; Palmer et al., 2011b) (Figura 7). La fosforilación de Drp1 por la kinasa Cdk1/cyclin B durante la mitosis produce un aumento de la fisión mitocondrial que asegura una eficiente segregación de las mitocondrias a las células hijas (Taguchi et al., 2007) y la posterior ubiquitinización por la E3 ubiquitin ligasa APC/C^{Cdh1} y degradación por el proteosoma permitirá el restablecimiento de la red mitocondrial (Horn et al., 2011). Sin embargo, el papel de Drp1 durante la herencia mitocondrial parece ser no esencial (Ishihara et al., 2009) y futuros estudios serán necesarios.

La kinasa Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) también actúa como un regulador “upstream” de la fisión mitocondrial durante la apoptosis, aunque la fosforilación de ninguna proteína implicada directamente en la morfología mitocondrial no ha sido descrita (Meuer et al., 2007). La proteína kinasa A (PKA) es otro de los reguladores de la fisión mitocondrial a través de la fosforilación en Drp1, que provoca una reducción en su actividad GTPasa (Cribbs and Strack, 2007; Chang and Blackstone, 2007) (Figura 7).

La fragmentación mitocondrial es un aspecto común de determinadas condiciones patológicas donde estas organelas no funcionan correctamente. El aumento de calcio intracelular, y la consiguiente defosforilación de Drp1 a través de calcineurina (Cereghetti et al., 2008; Cereghetti et al., 2010) (Figura 7), ha sido descrito como uno de los mecanismos responsables de este aumento de fisión, aunque la inhibición de la fusión también se ha visto importante para este proceso (Duvezin-Caubet et al., 2006; Guillery et al., 2008a). En el proceso de la mitofagia (descrito más abajo), la defosforilación de Drp1 por calcineurina también ha sido identificada en células deficientes de PINK1 y responsable del aumento de fisión mitocondrial (Sandebring et al., 2009).

El aumento en células neuronales de óxido nítrico, molécula señalizadora implicada en una gran variedad de procesos celulares y que se une covalentemente a proteínas en un proceso llamado S-nitrosilación, resulta en cambios ultraestructurales a nivel mitocondrial con un incremento de la fisión (Barsoum et al., 2006; Cho et al., 2009). Estos cambios se han observado también después de la expresión de la proteína β -amiloide, el mediador principal

en la enfermedad de Alzheimer, el cual, tras la formación de oligómeros, estimula el estrés nitrosativo (Cho et al., 2009; Nakamura et al., 2010). Se ha propuesto que tales alteraciones de la morfología mitocondrial ocurren a través de la S-nitrosilación de Drp1, causando un incremento de la actividad GTPasa y dimerización de Drp1 (Cho et al., 2009; Nakamura and Lipton, 2011) (Figura 7).

La ubiquitinización de Drp1, a través de la E3 ubiquitina ligasa asociada a la membrana mitocondrial externa MARCH5/MITOL, se ha propuesto como moduladora de la fragmentación mitocondrial, regulando negativamente la formación de los complejos de fisión (Karbowski et al., 2007) (Figura 7). Ensayos de co-inmunoprecipitación también revelaron la interacción directa de MARCH5 con Mfn2 y las formas ubiquitinizadas de Drp1 y Fis1 (Nakamura et al., 2006; Yonashiro et al., 2006). Previamente, a MARCH5/MITOL se le había

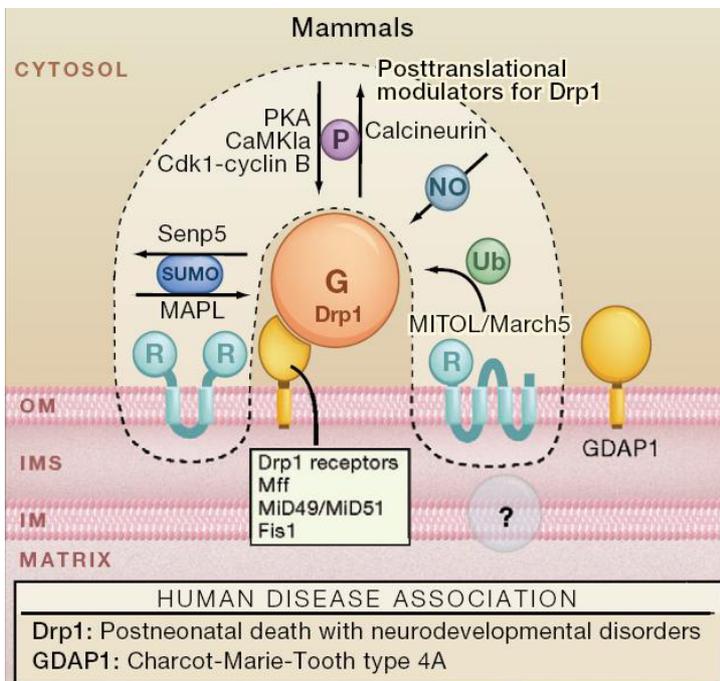


Figura 7: **Mecanismos de regulación de la fisión mitocondrial.** Diferentes tipos de modificaciones postraduccionales regulan Drp1 en mamíferos. La actividad de Drp1 está regulada por la ubiquitinización dependiente de MITOL/March5, de SUMOilación, fosforilación y N-nitrosilación. En este esquema también aparecen otras proteínas implicadas en fisión mitocondrial así como la asociación de estas con algunas enfermedades humanas. Adaptación: (Tamura et al., 2011).

atribuido un papel pro-fusión (Nakamura et al., 2006; Yonashiro et al., 2006), sin embargo, en subsecuentes estudios de silenciamiento o sobreexpresión del dominante negativo de esta ligasa, la distribución y movilidad de Drp1 estaba alterada, resultando en una reducción de los eventos de fisión y aparición de mitocondrias más alargadas (Karbowski et al., 2007; Park et al., 2010b).

La SUMOilación es otro de los procesos que regulan la actividad de Drp1 (Figura7). SenP5 es una SUMO proteasa que se transloca a la mitocondria durante la mitosis, desumoilando DRP1 para asegurar que las mitocondrias son transmitidas a las células hijas (Zunino et al., 2007; Zunino et al.,

2009). Drp1 es sumoilada por la proteína pro-apoptótica Bax, produciendo la translocación en la mitocondria independientemente de Fis1 (Wasiak et al., 2007), sin embargo, una forma de Drp1 que no puede ser sumoilada también es reclutada en la mitocondria después de un estímulo apoptótico, sugiriendo que esta modificación no es específica de apoptosis (Figueroa-Romero et al., 2009). SUMO E2 ligasa Ubc9 y la proteína asociada a la membrana mitocondrial externa MAPL también regulan la sumoilación de Drp1 aumentando su

estabilidad y consiguientemente la fisión mitocondrial (Harder et al., 2004; Li et al., 2008b; Neuspiel et al., 2008; Braschi et al., 2009).

La entrada de calcio durante la actividad sináptica se ha descrito como otro proceso implicado en la regulación de la morfología mitocondrial. La aplicación de glutamato en cultivos primarios, provoca una alteración de las mitocondrias pasando desde formas alargadas a más redondeadas y que es dependiente de la entrada de calcio (Rintoul et al., 2003), efecto que también ha sido descrito después de una despolarización inducida por KCl y consiguiente activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (Han et al., 2008). Este cambio de morfología ha sido atribuido a la fosforilación de Drp1 por CaMKII-alfa (Figura7) que facilitan el reclutamiento de esta proteína a las mitocondrias y provoca su fragmentación (Han et al., 2008). Miro1, responsable de la parada mitocondrial tras una despolarización, también regula la morfología mitocondrial de forma dependiente de calcio, produciendo una inhibición de Drp1 en niveles basales de calcio y favoreciendo la fisión cuando estos niveles son elevados (Saotome et al., 2008) (Figura 8) por lo que varios sensores de calcio podrían regular la activación de Drp1 (Liu and Hajnoczky, 2009).

Drp1 también es necesaria para el correcto posicionamiento de las mitocondrias en las neuronas (Smirnova et al., 1998; Pitts et al., 1999) y la sobreexpresión de Drp1 provoca una mayor densidad mitocondrial a lo largo de las dendritas incrementando así el número de espinas y sinapsis excitatorias (Li et al., 2004b). De manera similar neuronas mutantes para Drp1 presentan una falta de mitocondrias en las sinapsis de las uniones neuromusculares de *Drosophila* que son incapaces de mantener una correcta neurotransmisión (Verstreken et al., 2005). Ambos estudios revelan la importancia de Drp1, y por consiguiente, de la fisión

mitocondrial, para la correcta formación y funcionamiento de las sinapsis. Así pues la entrada de calcio en las neuronas no sólo produce la parada de las mitocondrias en los lugares correctos sino también una fragmentación mitocondrial necesaria para la transmisión sináptica, por lo que una correcta maquinaria para el transporte y morfología mitocondrial es imprescindible para el correcto funcionamiento de la neurotransmisión.

A pesar de que el citoesqueleto no parece ser necesario para mantener la forma tubular o fusión de las mitocondrias (Legros et al., 2002; Mattenberger et al., 2003), claro está el

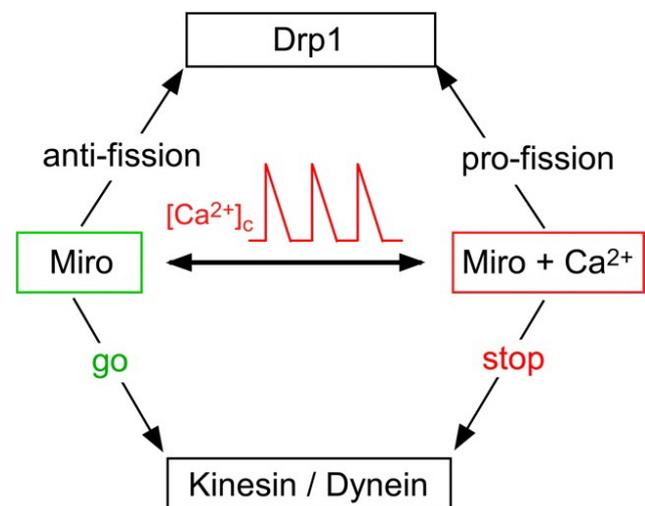


Figura 8: Representación esquemática ilustrando el control bidireccional dependiente de calcio de la motilidad y morfología mitocondrial a través de la proteína Miro. Adaptación: (Saotome et al., 2008).

papel que juega actuando como rail permitiendo la aproximación necesaria para que se de la fijación de las membranas mitocondriales opuestas previa a un proceso de fusión (Koshiba et al., 2004; Bowes and Gupta, 2008), y también podría actuar como soporte sobre el cual generar tracción y colaborar así en la separación de dos mitocondrias durante un proceso de fisión (Roux et al., 2006). Son también varios los estudios que destacan la importante relación entre la maquinaria de transporte a través del citoesqueleto y la morfología mitocondrial. Así, la depleción de Miosina V produce una alteración en la morfología de estas organelas, con un aumento de la longitud mitocondrial (Pathak et al., 2010). La pérdida de función de la dineína no sólo altera la distribución mitocondrial, sino también esta asociada al reclutamiento de Drp1 (Varadi et al., 2004). Las proteínas Miro, responsables de la unión de las kinesinas con los microtúbulos, también se han sugerido por alterar la morfología mitocondrial a través de la inhibición de Drp1 (Saotome et al., 2008) y la ausencia o ciertas mutaciones de Mfn2 produce una disminución del transporte mitocondrial y su interacción con el complejo Miro/Trak2, pero no KIF5C, también ha sido observada (Baloh et al., 2007; Misko et al., 2010).

En conjunto, estos ensayos hacen pensar que los procesos de que rigen el transporte y la morfología mitocondrial están íntimamente asociados y las señales celulares que regulan alguno de estos procesos causarán directa o indirectamente una alteración en el segundo, sin embargo, los precisos mecanismos por lo que estos procesos están asociados y su funcionamiento, todavía deben de ser detallados.

1.4.- Mitofagia

La autofagia es un proceso por el cual las mitocondrias, al igual que otras organelas celulares, son recicladas y degradadas a través de un mecanismo especializado. Este proceso, consiste en la encapsulación por una estructura de doble membrana conocida como autofagosoma de los orgánulos dañados y posterior degradación (Nakatogawa et al., 2009; Yang and Klionsky, 2010). Existen diferentes tipos de autofagia en función de la naturaleza de los componentes encapsulados, siendo la mitofagia el proceso específico de reciclaje de las mitocondrias (Tolkovsky et al., 2002; Kim et al., 2007).

La mitofagia se ha descrito como uno de los mecanismos de “control de calidad” celular por el cual las mitocondrias que resultan dañadas, presentan bajo potencial de membrana o acumulan sustancias tóxicas son específicamente eliminadas (Tatsuta and Langer, 2008; Dagda and Chu, 2009; Whitworth and Pallanck, 2009), de forma que la célula puede continuar funcionando normalmente. Son varios los mecanismos descritos actualmente a través de los cuales se da la mitofagia como los descubiertos en levaduras o en las células rojas de la sangre (Youle and Narendra, 2011), sin embargo, el mecanismo que involucra a las proteínas Parkina y Pink1 (Figura 9) es el que presenta una mayor relevancia en el contexto de las células nerviosas y que ha sido asociado con trastornos neurodegenerativos, en

concreto, la enfermedad de Parkinson (Kitada et al., 1998; Valente et al., 2004; Gasser, 2009).

Parkina es una E3 ubiquitin ligasa citosólica que se transloca hacia la mitocondria después de una inducción de stress, producida por una gran variedad de estímulos, como un descenso del potencial de membrana, la administración de toxinas mitocondriales (Narendra et al., 2008) o azida en células que carecen de DNA mitocondrial (Suen et al., 2010). Además, parkina se acumula exclusivamente en las mitocondrias dañadas sin hacerlo en las mitocondrias sanas de la misma célula (Narendra et al., 2008), lo que refuerza la idea que la mitofagia un mecanismo “control de calidad”.

El gen PINK1 codifica para una Ser/Thr Kinasa mitocondrial (Gandhi et al., 2006; Zhou et al., 2008), que acta “up-stream” de parkina (Exner et al., 2007; Dagda et al., 2009), siendo el responsable de “la translocación de esta parkina a las mitocondrias dañadas y de la inducción de la mitofagia mediada por parkina (Geisler et al., 2010; Matsuda et al., 2010; Narendra et al., 2010; Vives-Bauza et al., 2010), aunque los precisos mecanismos por los que esta translocación ocurre todavía no han sido aclarados.

PINK1 es expresado e importado a todas las mitocondrias y luego rápidamente degradado por proteólisis, manteniéndose en bajos niveles. Cuando una porción de las

mitocondrias resultada dañada, la proteólisis de PINK1 se inhibe, permitiendo la acumulación de PINK1 únicamente en las mitocondrias dañadas y el consiguiente reclutamiento de parkina (Matsuda et al., 2010; Narendra et al., 2010). Recientes estudios parecen indicar que la proteasa PARL es la responsable de este procesamiento de forma dependiente de voltaje (Jin et al., 2010; Deas et al., 2011; Meissner et al., 2011). Tras su translocación a las mitocondrias, parkina promueve la ubiquitinización de sustratos mitocondriales (Geisler et al., 2010; Matsuda et al., 2010) y promueve la activación del sistema ubiquitina-proteosoma que permitirá la degradación de un número importante de proteínas de la membrana externa (Chan et al., 2011).

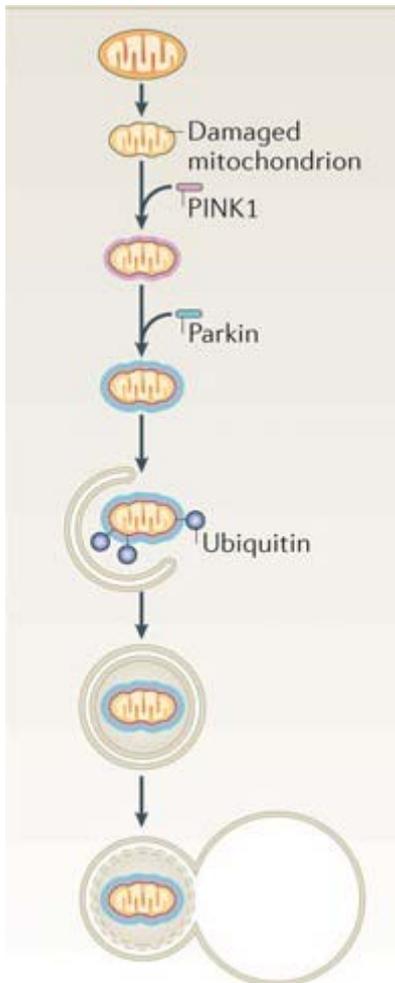


Figura 9: La vía de PINK1-parkina de mitofagia. La Mitofagia requiere el marcaje específico de las mitocondrias y su reclutamiento en membranas aisladas. Cuando las mitocondrias están dañadas y pierden el potencial de membrana, la kinasa PINK1 (PTEN-induced putative kinase protein 1) se acumula (mostrado como un halo alrededor de la mitocondria) y recluta la E3 ubiquitin ligasa parkina desde el citosol específicamente a las mitocondrias dañadas. Parkina ubiquitina proteínas mitocondriales y provoca que la mitocondria sea engullida por membranas aislantes que se fusionaran con los lisosomas. Esto mediará el “control de calidad” mitocondrial. Adaptación: (Youle and Narendra, 2011).

La regulación de la morfología y el transporte mitocondrial se han visto que son imprescindibles para el correcto desarrollo de la mitofagia. En el caso de las neuronas, las mitocondrias viajan en sentido anterógrado para su degradación y reciclaje en el soma celular lo que se ha demostrado que es importante para los procesos de autofagia (Miller and Sheetz, 2004). Una vez parkina es translocada a las mitocondrias, estas son transportadas a través del citoesqueleto de microtúbulos y se concentran en la región perinuclear donde finalmente son degradadas (Okatsu et al., 2010). No resulta extraño que PINK1 interaccione con el complejo Miro/Milton y haya sido sugerida su función en el tráfico mitocondrial (Weihofen et al., 2009). Un reciente estudio, sin embargo, postula que la unión de PINK1 con las proteínas Miro conlleva a una rápida degradación de esta última y consecuentemente al arresto mitocondrial, permitiendo así, el aislamiento de otras mitocondrias. Posteriormente, estas mitocondrias serían envueltas por el autofagosoma y transportadas retrógradamente de forma independiente del complejo Miro/Milton (Wang et al., 2011b).

En lo que respecta a la regulación de la morfología mitocondrial ha sido descrito que tanto en levaduras como en células de mamíferos, la mitofagia esta precedida por una fisión mitocondrial (Westermann, 2010b) que divide los túbulos mitocondriales en porciones más pequeñas, manejables para la encapsulación y producirá la segregación del material dañado para su eliminación selectiva (Twig et al., 2008). Las mitofusinas 1 y 2 también son objetivo del complejo PINK1/parkina, que hará que sean rápidamente degradadas, promoviendo la fragmentación mitocondrial, posibilitando la mitofagia e impidiendo la re-fusión entre mitocondrias sanas y dañadas (Gegg et al., 2010; Poole et al., 2010; Tanaka et al., 2010; Glauser et al., 2011).

A pesar de ello, el papel exacto que ejerce la morfología mitocondrial durante la mitofagia todavía presenta ciertas controversias. Es pensado que PINK1 y parkina promueven la fisión mitocondrial en *Drosophila*, donde mutaciones o el silenciamiento de estas proteínas producen una disminución de la fisión, y la expresión de Drp1 o Fis1 restablecería el fenotipo normal (Deng et al., 2008; Poole et al., 2008; Yang et al., 2008; Ziviani et al., 2010). En contraste, estudios realizados en células de mamífero, han mostrado efectos muy diferentes de PINK1/parkina en la morfología, sugiriendo un papel pro-fusión. (Exner et al., 2007; Dagda et al., 2009; Lutz et al., 2009; Sandebring et al., 2009; Weihofen et al., 2009; Cui et al., 2010). Además, también se ha demostrado que Drp1 sería un sustrato de la degradación de PINK1/parkina en células Hela, por lo que favorecería la idea que estas proteínas promueven fusión (Wang et al., 2011a).

Existe la posibilidad de que estos efectos en la morfología sean dependientes del tipo o estadio celular (Mai et al., 2010), sin embargo, estudios en neuronas hipocampales y dopaminérgicas de mamíferos que muestran un fenotipo similar al de *Drosophila* (Yu et al., 2011), hacen pensar en la interpretación que, la regulación de los procesos de fusión y fisión durante la mitofagia, son secundarios a los efectos directos causados por PINK1/parkina, y

futuros estudios serán necesarios para una detallada comprensión de este proceso (Thomas and Cookson, 2009).

1.5.- Dinámica mitocondrial y enfermedades neurodegenerativas

Aunque las mitocondrias son organelas críticas para todas las células, las neuronas son extremadamente sensibles a alteraciones en su normal función mitocondrial. Las neuronas son células altamente especializadas con largos procesos que presentan una alta actividad que incluye la transducción de la señal intercelular a través de la liberación de los neurotransmisores desde las sinapsis (Chen and Chan, 2006). Además de suplir energéticamente, las mitocondrias también tienen un papel crítico en la plasticidad sináptica a través del mantenimiento de la homeostasis de calcio (Li et al., 2004b).

Así pues, la habilidad de las mitocondrias para fusionarse, dividirse y migrar a través de los procesos neuronales es particularmente importante y alteraciones en estos procesos, directamente a través de mutaciones en las proteínas implicadas, o indirectamente afectando los procesos que regulan la dinámica mitocondrial, son causa de una serie de enfermedades neurodegenerativas (Figura 10) (Frank, 2006; Kwong et al., 2006; Mandemakers et al., 2007; Chen and Chan, 2009; Han et al., 2010; Palmer et al., 2011b; Schon and Przedborski, 2011).

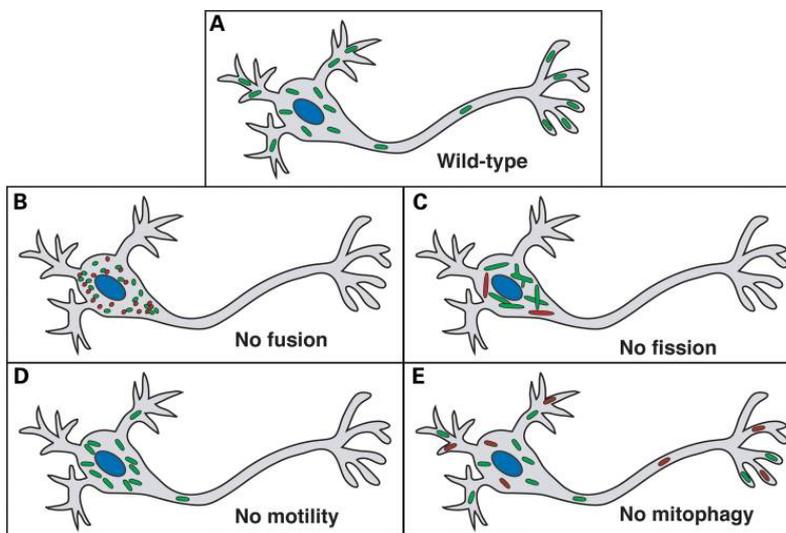


Figura 10: Defectos en la dinámica mitocondrial que conllevan a una disfunción neuronal. (A) En neuronas wild-type, las mitocondrias viajan grandes distancias desde el cuerpo celular hacia las dendritas y terminal axónicos, donde juegan importantes papeles en la producción de ATP y la homeostasis del calcio. (B) En ausencia de fusión, la población mitocondrial se fragmenta y una porción muestra defectos ultraestructurales y disfunción (rojo). Las mitocondrias secundariamente acumularán defectos que impedirán la correcta distribución hacia la periferia. (C) En ausencia de fisión, la población mitocondrial es excesivamente alargada e

interconectada, y una parte muestra disfunción (rojo). Estas mitocondrias forman un cluster en el soma celular y no son eficientemente transportadas hacia la periferia. (D) Defectos en el transporte mitocondrial impiden de una correcta distribución de las mitocondrias hacia la periferia. (E) En ausencia de mitofagia, mitocondrias dañadas (rojo) se acumulan en la neurona. Adaptación: (Chen and Chan, 2009).

1.5.1.- Charcot Marie Tooth

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) comprende un grupo heterogéneo de neuropatías periféricas con un fenotipo clínico bastante uniforme. Su clasificación en función del patrón de herencia, la intensidad de sus síntomas o la mutaciones de los genes implicados

en su desarrollo, hacen que tenga una clasificación complicada y que se actualiza constantemente en función de nuevos descubrimientos (Shy, 2004; Casanovas et al., 2008; Schon and Przedborski, 2011).

CMT2A esta asociado a mutaciones en el gen de Mfn2 (Zuchner et al., 2004; Kijima et al., 2005; Lawson et al., 2005; Detmer et al., 2008) sobretodo relacionadas con su dominio GTPasa, esenciales para llevar a cabo la fusión mitocondrial. CMT2A es una neuropatía que afecta a nervios sensoriales y motores de las extremidades, sin embargo, diferentes fenotipos han sido hallados en función de la mutación encontrada (Chung et al., 2006; Verhoeven et al., 2006; Banchs et al., 2008; Brockmann et al., 2008; Del Bo et al., 2008), incluyendo la afectación del nervio óptico (Zuchner et al., 2006).

Además de Mfn2, los genes que codifican para la kinesina KIF1B, asociada a CMT2A (Zhao et al., 2001) y GDAP1 asociado a CMT4A (Pedrola et al., 2005), codifican para proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial que también están afectadas en esta enfermedad.

1.5.2.- Atrofia Óptica Dominante

La Atrofia Óptica dominante (DOA) es conocida como la neuropatía óptica hereditaria más común y que representa una degeneración de la capa de células ganglionares, con la consiguiente atrofia del nervio óptico (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000; Delettre et al., 2002). Mutaciones en el gen OPA1 han sido asociadas a esta enfermedad y los pacientes muestran alteraciones en la distribución mitocondrial y a nivel funcional, una disminución de la respiración celular, una baja tasa de proliferación y una alta tasa de apoptosis (Olichon et al., 2003).

Al igual que CMT, DOA presenta una variación considerable en el examen clínico, incluyendo una neuropatía periférica sensorial y motora, lo que indica una compleja correlación genotipo-fenotipo (Toomes et al., 2001; Amati-Bonneau et al., 2008; Hudson et al., 2008). En estas dos enfermedades, la patofisiología no está completamente establecida, si bien está claro que la disfunción mitocondrial es el origen de la alteración.

1.5.3.- Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es el desorden neurodegenerativo más común, caracterizado por la formación de ovillos de neurofibrillas y placas de β -amiloide, con una consiguiente pérdida sináptica y muerte neuronal (Selkoe, 2002). Como rasgos característicos de la AD también se ha descrito una mala función mitocondrial, alteración en la homeostasis del calcio y una elevada producción de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias (Beal, 2005; Santos et al., 2010b), que evidencian un “link” entre la AD y el correcto

funcionamiento de estas organelas.

Además, en los cerebros de pacientes de AD, se encuentran alteraciones en las crestas mitocondriales y una disminución del tamaño mitocondrial (Baloyannis, 2006), con los niveles de las proteínas Drp1, OPA1, Mfn 1/2 significativamente disminuidos y los niveles de hFis1 aumentados, que resultan en un colapso de la red mitocondrial, en la reducción del número de mitocondrias en los procesos neuronales y en una menor formación de espinas dendríticas (Wang et al., 2008a; Wang et al., 2008b; Wang et al., 2009b). La inflamación de los axones en un estadio temprano de la enfermedad, también provoca una acumulación de las mitocondrias que se ha visto que puede contribuir a la pérdida de las sinapsis (Stokin et al., 2005), lo que sugiere que una disminución del transporte axonal mitocondrial puede ser uno de los primeros síntomas detectables en la AD.

La formación de oligómeros de β -amiloide también regulan la morfología mitocondrial, incrementando la producción de ácido nítrico y consiguiente S-nitrosilación de Drp1, con un aumento de la fragmentación mitocondrial (Dorheim et al., 1994; Barsoum et al., 2006; Cho et al., 2009; Nakamura et al., 2010). Recientemente también se ha descrito que Cdk5, que actúa como un importante mediador de la patogénesis de la AD (Tsai et al., 2004; Gong and Iqbal, 2008), puede actuar también como mediador de la fisión mitocondrial (Meuer et al., 2007; Sun et al., 2008). Todas estas evidencias sugieren una probable participación secundaria de la dinámica mitocondrial en la AD.

1.5.4.- La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (PD) está causada por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, región importante para la regulación del control motor. Varias son las evidencias que sugieren un papel relevante de las mitocondrias asociado a la PD, entre las que se encuentran mutaciones en dos genes responsables de la mitofagia, PINK1 y parkina (Dodson and Guo, 2007; Bueler, 2009; Van Laar and Berman, 2009; Winklhofer and Haass, 2010). Además, la deficiencia de alguna de estas dos proteínas ha sido relacionada con una reducción de la viabilidad neuronal, aparición de defectos en la funcionalidad y morfología mitocondrial (Palacino et al., 2004; Gautier et al., 2008; Wood-Kaczmar et al., 2008), que pone de relieve la importancia de la mitofagia en la aparición de las enfermedades neurodegenerativas (Batlevi and La Spada, 2010).

Consistente con esto, el excesivo daño mitocondrial ha sido asociado a la PD (Schapira, 2008), y deleciones en el mtDNA se acumulan con la edad y más comúnmente en la sustancia negra (Bender et al., 2006; Kraytsberg et al., 2006), lo que sugiere que la PD puede ser provocada por la acumulación de daño mitocondrial, ya sea por estrés excesivo o por fallos en el proceso de eliminación de las mitocondrias dañadas por mitofagia.

1.5.5.- La enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (HD) es un desorden neurodegenerativo con herencia autonómica dominante, causada por una expansión de repeticiones CAG entre el gen de la huntingtina (Htt) (Andrew et al., 1993; Walker, 2007). Anormalidades en las mitocondrias, como una disminución del transporte y cambios en la ultraestructura mitocondrial, se han observado en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Chang et al., 2006b; Bossy-Wetzels et al., 2008; Sack, 2010). Más importante aun, fragmentos de Htt han sido asociados con mitocondrias alterando el transporte asociado con microtúbulos hacia y desde las sinapsis (Orr et al., 2008), lo que concuerda con la posible interacción con la proteína de la maquinaria de transporte Milton (Stowers et al., 2002) y con la interacción de la forma mutante con las proteínas motoras kinesina y dineína (Trushina et al., 2004). Además, el silenciamiento de la forma endógena de Htt también afecta el transporte mitocondrial, lo cual puede explicar los defectos en el transporte de las mitocondrias por el reclutamiento de la Htt mutante por la maquinaria de transporte mitocondrial (Trushina et al., 2004).

La expresión de Htt mutante también produce cambios en la morfología mitocondrial, aumentando los niveles de los mediadores Drp1 y Fis1 y disminuyendo los de Mfn 1/2 y OPA1 (Shirendeb et al., 2011), lo que conlleva a un incremento de la fragmentación y la alteración de las crestas mitocondriales. Además, se ha descrito la interacción de la Htt mutante con Drp1 que producen un aumento de su actividad GTPasa, oligomerización (Song et al., 2011) y un incremento en la defosforilación de Drp1 a través de calcineurina (Costa et al., 2010) y consiguiente traslocación a la mitocondria. Estos efectos en el transporte y la morfología pueden ser rescatados por la sobreexpresión de un dominante negativo de Drp1 (Drp1K38A) o Mfn2 (Wang et al., 2009a; Song et al., 2011) que evidencian la importancia de estas proteínas como nuevas dianas terapéuticas en la HD.

1.5.6.- Paraplegia espástica hereditaria

La Paraplegia espástica hereditaria (HSP) pertenece a un grupo genéticamente heterogéneo de desordenes neurológicos caracterizados por una debilidad progresiva y espasticidad en las extremidades inferiores. Se han identificado un gran número de loci que han sido asociados con esta enfermedad (Schon and Przedborski, 2011), algunos de los cuales codifican para proteínas mitocondriales o que se ha visto alteran la función mitocondrial (McDermott et al., 2003b).

Varios de los genes asociados con la HSP, han sido descritos por alterar el transporte y la morfología mitocondrial, indicando una implicación de la dinámica de estas organelas en el desarrollo de la enfermedad. A través de modelos animales, se ha descrito que tanto paraplegina, una metaloproteasa mitocondrial (Atorino et al., 2003; Ferreira et al., 2004), como la espastina, principal causante de la HSP y reguladora de la organización de los

microtúbulos (McDermott et al., 2003a; Kasher et al., 2009), impiden el transporte axonal de las mitocondrias, siendo estos cambios detectables antes de la aparición de la inflamación y degeneración axonal. Paraplegina además, también se ha relacionado con el procesamiento de OPA1 y consiguientemente con la alteración de la morfología mitocondrial (Ishihara et al., 2006). Mutaciones en el gen KIF5A, kinesina asociada con el transporte mitocondrial a través de microtúbulos, también se han encontrado en pacientes con HSP (Ebbing et al., 2008) y CMT (Crimella et al., 2011), lo que pone de relieve la heterogeneidad y la importancia de la dinámica mitocondrial en estas enfermedades.

1.5.7.- Nuevo caso asociado a Drp1

Además de las enfermedades descritas anteriormente, la mutación en un gen de la maquinaria de la morfología mitocondrial, Drp1, también ha sido descrita como causante de defectos en la fisión mitocondrial y de los peroxisomas de una paciente que presentaba un síndrome neuropático muy severo, con microcefalia, desarrollo cerebral anormal, atrofia óptica e hipoplasia y que fue letal a los 37 días de edad (Waterham et al., 2007). Esta mutación se encuentra en el dominio responsable de la tetramerización de Drp1, afectando el reclutamiento mitocondrial o la retención (Chang et al., 2011), actuando directamente sobre la fisión mitocondrial.

El hecho que Drp1 ha sido asociada en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Reddy et al., 2011), la severidad de los síntomas corroborada por modelos animales knock-out (Ishihara et al., 2009; Wakabayashi et al., 2009) y los pocos casos descritos de una degeneración similar, sugieren que defectos en la fisión mitocondrial tienen peores consecuencias que las causadas por defectos en la fusión, posiblemente afectando al correcto transporte mitocondrial e impidiendo una correcta segregación de los componentes dañados en la mitocondria para su mitofagia (Figura 10).

2.- Vías de señalización a través de Wnts

2.1.- Introducción

Las proteínas Wnt, representan una gran familia de proteínas secretables, constituida por 19 miembros identificados actualmente en humanos, y que se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución (Nusse, 2001; Prud'homme et al., 2002). Esta nueva familia de proteínas, está ampliamente descrita por estar implicada en vías de señalización que juegan un papel fundamental en una gran variedad de procesos que incluyen: patrón celular, proliferación, diferenciación, orientación, adhesión, supervivencia y apoptosis (Nusse and Varmus, 1982; Wodarz and Nusse, 1998; Smalley and Dale, 1999; Patapoutian and Reichardt, 2000; Chong and Maiese, 2004; Nelson and Nusse, 2004; Nusse, 2005; Li et al., 2006; van Amerongen and Nusse, 2009).

La diversidad de los genes Wnt, ya presente en los Cnidarios (Guder et al., 2006), no solo indica un origen temprano en la evolución, sino también que ha permanecido esencial para el correcto desarrollo de los animales multicelulares. Esta complejidad, también se encuentra en los receptores de 7 segmentos transmembrana Frizzled (Fz) (hasta 10 tipos diferentes se han encontrado en mamíferos), con un lugar de unión para las proteínas Wnt en forma de un dominio rico en cisteína (CRD) (Bhanot et al., 1996; Wang et al., 2006).

Además de las proteínas Wnt y sus receptores transmembrana Fz, otros componentes de la transducción de la señal, fueron identificados en posteriores estudios en *Drosophila* y funcionalmente caracterizados por experimentos epistáticos. Los homólogos en mamíferos de estos componentes, incluyen los efectores Dishevelled (Dvl), la kinasa de la glucógeno sintasa 3 (GSK3 β), β -catenina y el factor celular T (TCF) (Peifer et al., 1991; Noordermeer et al., 1994; Siegfried et al., 1994; Sussman et al., 1994; Dominguez et al., 1995; Sokol et al., 1995; Brunner et al., 1997; van de Wetering et al., 1997) y que configuran lo que actualmente se conoce como la vía canónica de Wnt o de Wnt/ β -catenina. Además de ésta, otras vías asociadas a las proteínas Wnts fueron descritas, como la vía de Wnt/Ca²⁺, que conlleva un aumento del calcio intracelular (Slusarski et al., 1997b; Kuhl et al., 2000a; Kuhl et al., 2000b), o la vía Wnt/PCP (“planar cell polarity”), implicada en procesos que controlan los movimientos de extensión convergentes durante el desarrollo de los vertebrados (Heisenberg et al., 2000; Tada and Smith, 2000). Éstas fueron denominadas en conjunto vías “no-canónicas” de Wnt y necesitarían de nuevos efectores para la transducción de la señal.

La transducción de Wnt-Fz controla varios procesos durante el desarrollo y la maduración del sistema nervioso central (Augustine et al., 1993; Ikeya et al., 1997; Salinas, 1999; Wheeler and Hoppler, 1999; Melton et al., 2004), cardiovascular (Park et al., 1996; Wheeler and Hoppler, 1999; van Gijn et al., 2001) y de las extremidades (Kengaku et al.,

1997), y el mal funcionamiento en estas vías conlleva a alteraciones en la morfogénesis en modelos animales (Stark et al., 1994; Ikeya et al., 1997; Liu et al., 1999a) y a defectos congénitos en humanos (Jordan et al., 2001; Rodova et al., 2002; Niemann et al., 2004). En tejidos maduros, estas vías están asociadas a la renovación de las células madre y el mantenimiento de muchos tejidos y, además, su desregulación frecuentemente esta asociada a cánceres y enfermedades degenerativas, que ponen de relevancia la importancia de la vías de señalización asociadas a Wnts.

2.1.1- Las proteínas Wnt y sus receptores

Desde su descubrimiento, se ha intentado agrupar los diferentes Wnts en clases a las que se les pudieran asignar actividades específicas. Como resultado, las proteínas Wnt originalmente fueron divididas en dos clases funcionales, “canónicas” y “no-canónicas”, dependiendo de su habilidad para inducir la formación de un eje corporal secundario en embriones de *Xenopus* (McMahon and Moon, 1989; Smith and Harland, 1991; Sokol et al., 1991; Moon et al., 1993) o por causar la transformación morfológica de las células mamarias de ratón C57MG (Wong et al., 1994), ambas alteraciones asociadas a un incremento en la actividad transcripcional de β -catenina (Shimizu et al., 1997).

Así, los miembros canónicos de Wnt, serían inductores de un eje corporal secundario en *Xenopus* y de transformar morfológicamente las células C57MG a través de la activación de β -catenina, e incluirían a Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8 y Wnt8a. Al contrario, los Wnts no-canónicos Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a y Wnt11 no podrían inducir la formación del eje secundario en *Xenopus* y tendrían poco efecto en la morfología de las células C57MG. Estos últimos, a través de su unión a los receptores Fz, podrían activar proteínas G heterotriméricas e incrementar los niveles intracelulares de Ca^{2+} o pueden inducir cambios en el citoesqueleto de actina de forma dependiente de Rho.

Las proteínas Wnt, para activar las cascadas de señalización canónica y no-canónica se unen en la superficie celular con los receptores transmembrana Frizzled, que consisten al menos en 10 miembros de esta familia y que comparten unas mismas características que incluyen un dominio de unión a las proteínas Wnt (CRD) y siete dominios transmembrana altamente conservados (Vinson et al., 1989; Adler et al., 1990; Wang et al., 1996; Hsieh, 2004; Schulte and Bryja, 2007). La especificidad de la unión de los diferentes Wnts con sus receptores Frizzled ha sido poco estudiada (Takada et al., 2005) y la activación de estas vías de señalización se ha demostrado más compleja con la participación de varios co-receptores y de nuevos receptores (Kikuchi et al., 2007).

Así, la proteína LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein) con un solo paso transmembrana (Pinson et al., 2000; Tamai et al., 2000; Wehrli et al., 2000; Mao et al., 2001) ha sido descrita como indispensable para la acumulación de β -catenina después de la

estimulación de Wnt, indicando que estos co-receptores son importantes para la vía de señalización canónica de Wnt (Tolwinski et al., 2003; Tamai et al., 2004; Bilic et al., 2007; Zeng et al., 2008).

Nuevas proteínas de la familia de los receptores tirosina kinasas (RTKs) han sido descritos por actuar como co-receptores o incluso por ser capaces de transmitir la señal de forma independiente de Frizzled. Los receptores tirosina kinasas (RTKs) de un solo paso transmembrana Ryk y Ror parecen funcionar como auténticos receptores para las proteínas Wnt, mediante la interacción a través del dominio Wif (Wnt inhibitory factor) en el caso de los receptores Ryk (Inoue et al., 2004; Lu et al., 2004) y por los dominios CRD en el caso de los receptores Ror (Forrester et al., 2004; Green et al., 2007).

Además, las proteínas G heterotriméricas también se han visto implicadas en ambas vías de señalización de Wnt, lo que concuerda con la secuencia proteica de Frizzled, altamente relacionada con los receptores acoplados a proteína G (GPCR) e incrementando la complejidad de la cascada de señalización (Wang and Malbon, 2004; Katanaev, 2010; Koval et al., 2011). Varios estudios describen la importancia de las proteínas G en las vías de señalización canónica (Liu et al., 1999b; Liu et al., 2001; Katanaev et al., 2005; Liu et al., 2005a; Egger-Adam and Katanaev, 2010) y no-canónica (Slusarski et al., 1997a; Slusarski et al., 1997b; Liu et al., 1999c; Wang and Malbon, 2003).

A la luz de los nuevos descubrimientos con la participación de estos co-receptores y de nuevos receptores, así como su diferente participación en las vías de señalización de Wnt, hacen incongruente referirse a un determinado Wnt como canónico o no canónico y parece ser que esta diferenciación es dependiente del contexto celular y de su interacción con estos co-receptores (Bejsovec, 2005; Grumolato et al., 2010; Verkaar and Zaman, 2010). Así, han sido ya varios los Wnts en los que se ha demostrado su participación en ambas vías de señalización, tales como Wnt3a (Samarzija et al., 2009), Wnt4 (Lyons et al., 2004), Wnt5a (He et al., 1997; Holmen et al., 2002; Mikels and Nusse, 2006) o Wnt11 (Tao et al., 2005; Cha et al., 2008).

En el caso de los diferentes receptores, este comportamiento dual también ha sido comprobado. Secuencias en el C-terminal de Frizzled habían sido implicadas en el establecimiento de la vía de señalización en *Drosophila* (Boutros et al., 2000). Sin embargo ahora hay varios ejemplos demostrando que un mismo receptor puede actuar en ambas vías de señalización, como es el caso de XFz7 (Medina et al., 2000; Sumanas et al., 2000; Sumanas and Ekker, 2001; Munoz et al., 2006) o Fz2 (Verkaar et al., 2009; Sato et al., 2010). Esta también es la situación para: LRP6, co-receptor que parecía ser un prerrequisito para inducir la vía canónica (Tamai et al., 2000; Wehrli et al., 2000) y que recientemente ha sido implicado en los movimientos de extensión convergentes y en el establecimiento de la polaridad en los tejidos en vertebrados, características de las vías no-canónicas (Tahinci et al., 2007; Bryja et al., 2009); los RTKs como Ryk (Cheyette, 2004; Bejsovec, 2005; Fradkin et al., 2010) o Ror2

(Oishi et al., 2003; Billiard et al., 2005; Li et al., 2008a; Winkel et al., 2008). Estos ejemplos hacen que, al igual que las proteínas Wnts, los receptores y co-receptores no puedan ser estrictamente divididos en clases con una actividad específica, siendo probablemente muchas de las respuestas observadas dependientes del estadio celular y específicas de tejido.

2.2.- Vía de señalización canónica

La vía canónica está considerada la vía más frecuente de señalización de las proteínas Wnt y de la que primero fueron identificados sus componentes. Es también llamada la vía dependiente de Wnt/ β -catenina o la vía de Wnt/ β -catenina debido a que regula los niveles de la proteína β -catenina para controlar la transcripción de los genes diana de Wnt.

β -catenina es una proteína de unos 92 Kda que tiene en su secuencia 12 repeticiones en tándem del dominio armadillo (arm). Este dominio está formado por unos 42 aminoácidos y consta de 3 alfa-hélices. El plegamiento conjunto de los sucesivos dominios arm forma una estructura tridimensional muy conservada que ofrece una superficie amplia para la interacción proteína-proteína (Huber et al., 1997; Daniels et al., 2001). Las proteínas con estos dominios se han involucrado en procesos de señalización intracelular y a funciones asociadas a citoesqueleto (Peifer et al., 1994).

En ausencia de Wnt, β -catenina está asociada con el complejo de proteínas de GSK3 β , CK1 α , Axina y la proteína supresora de tumores APC (adenomatous polyposis coli) entre otros y es fosforilada conllevando a su ubiquitinización y subsiguiente degradación por el proteosoma (Aberle et al., 1997; Hart et al., 1999; Latres et al., 1999; Winston et al., 1999; Su et al., 2008) (Figura 11). Como resultado, β -catenina no puede ser translocada al núcleo y activar la transcripción de los genes diana. En ausencia de β -catenina en el núcleo, las proteínas TCF (T-cell factor) y Lef (lymphocyte enhancer factor) están asociados con inhibidores transcripcionales tales como Groucho (Cavallo et al., 1998; Roose et al., 1998).

En presencia de las proteínas Wnt, estas se unen a los receptores Frizzled y activarán la vía canónica solo en presencia del co-receptor LRP5/6 (Pinson et al., 2000; Wehrli et al., 2000; Mao et al., 2001) formándose un complejo trimolecular. La formación de este complejo, mediará la degradación de Axina (Mao et al., 2001) y permitirá el reclutamiento de Dvl, una fosfoproteína citoplasmática multifuncional, que traduce inicialmente la señal en las vías de señalización canónicas y no canónicas (Axelrod et al., 1998; Boutros et al., 1998; Boutros and Mlodzik, 1999).

En mamíferos existen 3 miembros de esta familia presentes en todos los órganos y que median la señalización de la vía canónica de Wnt de forma diferencial (Lee et al., 2008). Están constituidos por 3 dominios altamente conservados que incluyen un dominio N-terminal DIX (por Dishevelled y Axina), un dominio central PDZ (Postsynaptic density-95, Discs-large and Zonula occludens-1) y un C-terminal DEP (Dishevelled, Egl-10 and

Pleckstrin) (Wharton, 2003; Habas and Dawid, 2005). A nivel de Dvl, la vía de señalización de Wnt puede ser separada en 3 diferentes cascadas dependientes de los 3 dominios altamente conservados de Dvl (Boutros et al., 1998; Moriguchi et al., 1999; Sheldahl et al., 2003; Montcouquiol et al., 2006; Gao and Chen, 2010). Además, Dvl también es translocada al interior del núcleo, lo que se ha revelado esencial para la vía de señalización canónica de Wnt (Itoh et al., 2005; Weitzman, 2005; Yokoyama et al., 2007; Gan et al., 2008).

Posterior al reclutamiento de Dvl por el complejo Wnt-Frizzled-LRP5/6, se produce la fosforilación por la caseína kinasa I ϵ (CKI ϵ) (Bryja et al., 2007) para formar un complejo con Frat1 e inhibir la actividad de GSK3 β (Ikeda et al., 1998; Papkoff and Aikawa, 1998; Lee et al., 1999; Kishida et al., 2001; Lee et al., 2001), lo que impide la fosforilación de β -catenina y su subsiguiente degradación. β -catenina se acumula entonces en el citoplasma y es translocada al núcleo (Cavallo et al., 1998; Ikeda et al., 1998; Roose et al., 1998; Akiyama, 2000), donde formará complejos con los miembros de la familia de factores de transcripción TCF/Lef, activándolos y permitiendo la transcripción y expresión de una variedad de genes diana de Wnt (Novak and Dedhar, 1999; Macdonald et al., 2007)(Figura 11).

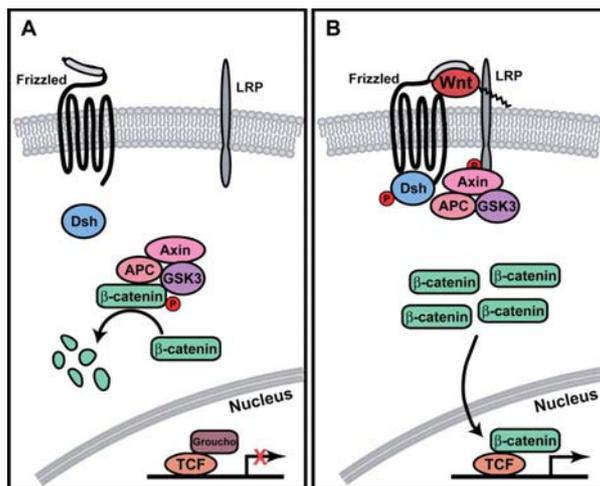


Figura 11: **Una visión general de la señalización canónica de Wnt.** (A) En células no expuestas a Wnt, β -catenina se asocia y es fosforilada por el complejo de destrucción compuesto por Axina, APC y GSK3 y la β -catenina fosforilada es objeto de degradación. Al mismo tiempo, los genes diana de Wnt se encuentran reprimidos por la asociación de TCF con Groucho. (B) La unión de Wnt con los receptores Frizzled y LRP induce la fosforilación de LRP y el reclutamiento de axina. Dvl es también fosforilado, y el complejo Axina-APC-GSK3 es inhibido, permitiendo la acumulación de β -catenina citosólica. La β -catenina se acumula y es translocada al núcleo, donde reemplaza a Groucho, uniéndose a TCF y activando los genes diana. Adaptación: (Gordon and Nusse, 2006).

Además de su papel como interruptor transcripcional en la vía de Wnt, β -catenina forma parte de las uniones adherentes, en las que se conectan los citoesqueletos de actina de células vecinas a través de la unión homotípica de miembros de la familia de las cadherinas (Yap et al., 1997). La β -catenina citosólica forma complejos con la cadherina y α -catenina, funcionando como un adaptador para unirse al citoesqueleto de actina (Jamora and Fuchs, 2002; Nelson and Nusse, 2004). Esta asociación puede secuestrar o liberar β -catenina al pool citosólico, responsable de activar la vía canónica de Wnt (Fagotto et al., 1996; Sadot et al., 1998; Simcha et al., 1998; Ilyas, 2005), lo cual se ha visto es regulado dependiendo del estado de fosforilación de la misma (Nelson and Nusse, 2004). La función de β -catenina en las uniones adherentes y en la vía de señalización canónica de Wnt la convierten en un excelente candidato a mediar la coordinación entre la dinámica de la adhesión celular y la activación de los programas genéticos, necesaria para muchos procesos como diferenciación, migración o

cambio de identidad celular.

Es también importante destacar que en la vía canónica de Wnt se han descrito gran número de reguladores de la actividad transcripcional. Así, además de GSK3 β , otras muchas kinasas y fosfatasa han sido implicadas en la estabilización/degradación de β -catenina, entre ellas PKC (Orford et al., 1997; Chen et al., 2000; Gwak et al., 2006), CKI α (Liu et al., 2002), CK2 (Song et al., 2000; Song et al., 2003) y PP2A (Su et al., 2008); o regulando su translocación al núcleo como Rac1 (Wu et al., 2008b) y también otros receptores como c-*RON* y cErbB2 (Bonvini et al., 2001; Danilkovitch-Miagkova et al., 2001; Graham and Asthagiri, 2004), factores de crecimiento como IGFs (Insulin-like growth factors) (Playford et al., 2000), EGF (Chen et al., 2000) o kinasas unidas a integrinas (D'Amico et al., 2000) se han descrito como moduladores de la vía canónica de Wnt.

2.3.- Vías de señalización no-canónicas

Las vías no-canónicas de Wnt, consisten principalmente en dos cascadas de señalización denominadas Wnt/PCP (planar cell polarity) y Wnt/Ca²⁺ en las que nuevamente es el contexto celular el que determinará la vía que se activará (Bryja et al., 2008).

En la vía Wnt/PCP, dos complejos antagonistas están localizados en lados opuestos de cada célula, Fz-Dvl-Diversina y Stbm (Strabismus, Vangl en vertebrados)-prickle (Pk) (Bastock et al., 2003; Veeman et al., 2003b) y mientras que diversina promueve la activación de Dvl y compite por su unión con Pk (Jenny et al., 2005; Moeller et al., 2006; Wu et al., 2008a), Pk antagoniza la actividad de Dvl impidiendo su localización en la membrana (Tree et al., 2002). En presencia de las proteínas Wnt, estas se unen a los receptores Frizzled en la membrana celular, interaccionando y promoviendo la activación de Dvl y de Daam1 (Dvl associated activator of morphogenesis 1) (Liu et al., 2008). Esta

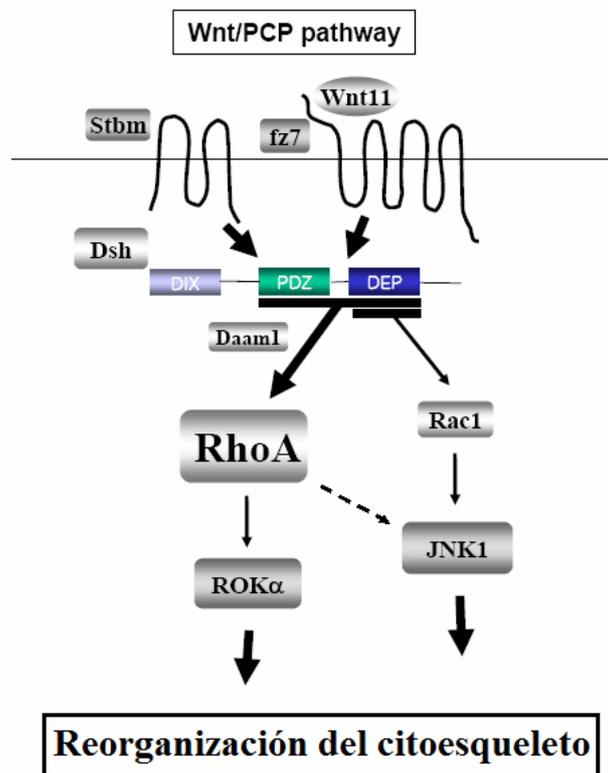


Figura 12: **Resumen esquemático de la vía de señalización Wnt/PCP.** Fz y Stbm actúan antagonicamente sobre Dvl para promover la polaridad planar. Wnt se une a Fz para activar Dvl y Daam1, lo cual permite la activación de las GTPasas pequeñas Rho y Rac1 a través de los dominios DEP y PDZ de Dvl. La activación de las GTPasas pequeñas promueve la activación de las kinasas ROCK y JNK que a través de la fosforilación de proteínas asociadas al citoesqueleto promoverá su reorganización. Adaptación: (Kim and Han, 2005).

interacción permitirá la formación de complejos con las GTPasas pequeñas Rho/Rac (Habas et al., 2001; Habas et al., 2003; Zhu et al., 2006) que a su vez activarán a la kinasa ROCK (Marlow et al., 2002; Kishida et al., 2004; Kim and Han, 2005) y la kinasa N-terminal Jun (JNK) (Moriguchi et al., 1999; Weston and Davis, 2002), conllevando a una regulación de la organización del citoesqueleto y a la expresión de genes (Figura 12).

Por otra parte, en la vía de calcio de Wnt, estos se unen a los receptores Frizzled, activando varios procesos celulares a través de Dishevelled (Sheldahl et al., 2003) y de la estimulación de las proteínas G heterotriméricas (Slusarski et al., 1997b). Esta activación, conllevará finalmente a un incremento de los niveles intracelulares de calcio, a través de la producción de los mediadores IP₃ y DAG por la fosfolipasa C (PLC) y a un aumento en la actividad de la fosfodiesterasa (PDE) específica de la guanosina cíclica monofosfato (cGMP), con la consiguiente disminución de los niveles de cGMP (Ahumada et al., 2002; Wang et al., 2004; Ma and Wang, 2006). Estos procesos activaran la CAMKII (Ca²⁺ - calmodulin-dependent protein kinase II) (Kuhl et al., 2000a), la calcineurina y la proteína kinasa C (PKC) (Sheldahl et al., 1999; Kohn and Moon, 2005) aumentando así la expresión específica de genes a través de NFAT y otros factores de transcripción (Kuhl et al., 2000b; Saneyoshi et al.,

2002; Veeman et al., 2003a; Wang and Malbon, 2003; Kuhl, 2004; De, 2011) (Figura 13).

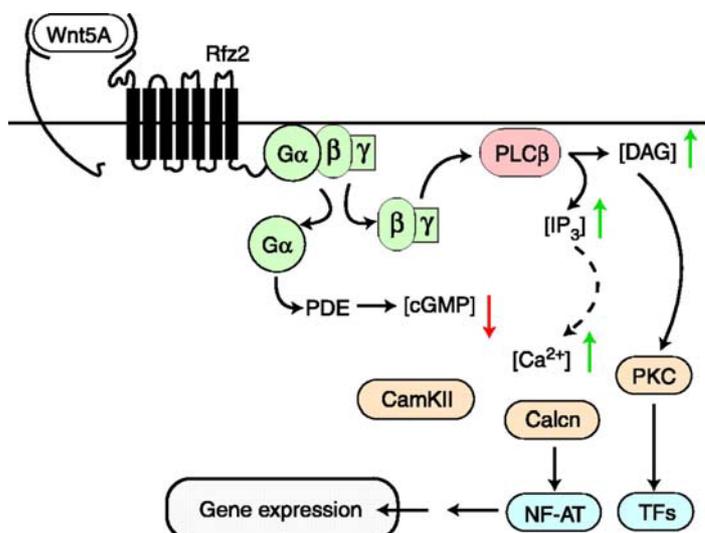


Figura 13: **Señalización Wnt-Ca²⁺ vía Frizzled.** La unión de Wnt5a actúa el receptor Rfz2 (Rat Frizzled-2), conllevando a la activación de las proteínas G (compuestas por las subunidades G α y G β/γ). G α activa entonces la PDE, que produce una disminución de la concentración intracelular de cGMP. Las subunidades G β/γ activan la fosfolipasa PLC β , que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato a inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ cataliza la liberación de las reservas de Ca²⁺ intracelular activando la kinasa CAMKII y la fosfatasa Calcineurina (Calc). El DAG activa PKC directamente. Tanto PKC como Calc influyen directa y indirectamente en la actividad de varios factores de transcripción (TFs) como por ejemplo NFAT. Adaptación: (Wang and Malbon, 2003).

Además de las vías hasta ahora descritas, las proteínas Wnt también activan otras cascadas de señalización consideradas como no canónicas (Semenov et al., 2007; Gao and Chen, 2010). Entre ellas figuran: la vía Wnt/RAP1 (Tsai et al., 2007) por la cual Wnt8 conlleva a la activación de RAP1 y por la cual regula el citoesqueleto de actina y la adhesión celular durante la gastrulación de los vertebrados; la vía Wnt/PKA (Chen et al., 2005a), implicada en la miogénesis de ratón y donde Wnt1 y Wnt7a activan la proteína kinasa A (PKA), el factor de transcripción CREB y la expresión de genes en el músculo; la vía Wnt-GSK3-MT (Hall et al., 2000; Orme et

al., 2003; Ciani et al., 2004; Ciani and Salinas, 2007; Salinas, 2007; Purro et al., 2008), que regula la remodelación del citoesqueleto a través de un mecanismo independiente de transcripción, mediante la inhibición y activación de la fosforilación vía Dvl de GSK3 y JNK sobre MAP1B, incrementando la estabilidad de los microtúbulos durante la formación de axones y la sinaptogénesis; la vía Wnt/aPKC (Suzuki et al., 2004; Chen et al., 2006b; Schlessinger et al., 2007; Zhang et al., 2007), en la que la señalización de Wnt-Fz induce la activación de PKC atípica (aPKC), posiblemente a través de la asociación de Dvl con el complejo aPKC/Par3/Par6, regulando MT y consecuentemente la polaridad epitelial y neuronal y la migración celular o la vía Wnt/mTOR (Mak et al., 2005; Inoki et al., 2006), en la que Wnt inhibe la fosforilación de GSK3 sobre TSC2 (tuberous sclerosis complex 2), activando así la regulación transnacional en tumorigénesis de m-TOR (mammalian target of rapamycin).

A diferencia de las vías arriba mencionadas, las proteínas Wnt también pueden activar otras cascadas de señalización independientemente de los receptores Fz. Estas cascadas de señalización dependen de los receptores Ryk (Lu et al., 2004; Liu et al., 2005b; Bovolenta et al., 2006; Schmitt et al., 2006; Fradkin et al., 2010), que median la repulsión de axones, la migración celular, el crecimiento de neuritas y la activación de TCF, y los receptores Ror2 (Schambony and Wedlich, 2007; Minami et al., 2010; Jung et al., 2011), por los que Wnt5a activa la vía PI3K-Cdc42-MKK7-JNK, resultando en la activación de los factores de transcripción ATF2 y c-jun y la expresión de PAPC. La interacción de Wnt5a con Ror2 también promueve el crecimiento del cono axonal a través de la activación de la proteasa calpaina (Yang et al., 2011), que también ha sido correlacionada con la motilidad de las células de melanoma (Nishita et al., 2006; O'Connell et al., 2010).

También es importante destacar que varias proteínas “down-stream” de la señalización Wnt/Frizzled pueden actuar independientemente con proteínas de otras cascadas celulares, por ejemplo, Dishevelled puede regular directamente la actividad de JNK (Li et al., 1999) y GSK3 β (Boutros et al., 1998) y además, las vías de señalización canónica y no-canónica no son totalmente autónomas, sus límites no son astringentes y hay varios grados de solapamiento entre ambas, especialmente en lo que se refiere a la antagonización de la vía canónica a través de diversas vías no-canónicas (Torres et al., 1996; Ishitani et al., 2003; Topol et al., 2003; Weidinger and Moon, 2003; Maye et al., 2004; Liao et al., 2006; Goto et al., 2010; Yuan et al., 2011), lo que da una idea de la complejidad del estudio de las vías de señalización asociadas a Wnt.

2.4.- Funciones asociadas a las vías de señalización de Wnt

Las vías de señalización de Wnt son una de las cascadas de señalización centrales en el desarrollo temprano de varios sistemas, como el sistema cardiovascular o las extremidades.

Recientes estudios también han demostrado que las vías de Wnt juegan un papel importante para regular muchos aspectos del desarrollo del sistema nervioso, desde “patterning” hasta la regulación de la plasticidad neural (Ciani and Salinas, 2005; Ille and Sommer, 2005; Salinas and Zou, 2008; Freese et al., 2010).

2.4.1.- “Patterning” anterior-posterior y desarrollo temprano del encéfalo

Durante el desarrollo del tubo neural, la inhibición de la vía de señalización canónica de Wnt en el extremo rostral es fundamental para la inducción del cerebro anterior. Debido a que los efectos de las proteínas Wnt son dosis dependientes, es necesario el establecimiento de un gradiente de Wnt desde el extremo rostral hasta el caudal. Así, los mutantes de Zebrafish headless carecen de ojos, cerebro anterior y algunas estructuras del cerebro medio debido a la mutación deletérea en Tcf3, un factor de transcripción que reprime la expresión de los genes diana de Wnt en los dominios anteriores (Kim et al., 2000).

Esta menos claro si la inhibición de Wnt es esencial para el desarrollo del cerebro anterior en mamíferos, sin embargo, evidencias a partir del ratón mutantes de LRP6 indican que gradientes similares pueden ser operativos en, al menos, algunas subregiones del cerebro anterior como el tálamo (Zhou et al., 2004a). De manera similar, la sobreexpresión de Wnt8c en un modelo de ratón transgénico conlleva a la pérdida de cerebro anterior y medio, y de otras estructuras anteriores neurales (Popperl et al., 1997). En la corteza, los ratones mutantes para Wnt3a, carecen de hipocampo debido a la inhibición de la proliferación de los precursores neurales hipocampales (Lee et al., 2000). En cambio, mutantes para Lef1 y LRP6, tienen defectos hipocampales más selectivos y fallan en la producción de neuronas granulares en el giro dentado (Galceran et al., 2000; Zhou et al., 2004b).

La vía canónica de Wnt también juega un papel importante en el desarrollo temprano del cerebelo, en concreto Wnt1, que presenta una alta expresión en el istmo y el labio rómbico (Wilkinson et al., 1987; Fischer et al., 2007), regulando la proliferación de precursores neuronales específicos (Panhuysen et al., 2004) y ratones mutantes para este gen carecen completamente o presentan severas malformaciones en el cerebelo (McMahon and Bradley, 1990; Thomas and Capecchi, 1990; McMahon et al., 1992). En estadios posteriores, la vía Wnt/ β -catenina también participará en el patterning durante el desarrollo de esta estructura, siendo especialmente activa en zona ventricular cerebelar y en las células que de ahí se originan (Selvadurai and Mason, 2011).

2.4.2.- “Patterning” dorso-ventral de la médula espinal

Debido a su bien conocida estructura anatómica y a la sencilla tratabilidad experimental, la médula espinal ha sido extensivamente usada como modelo experimental

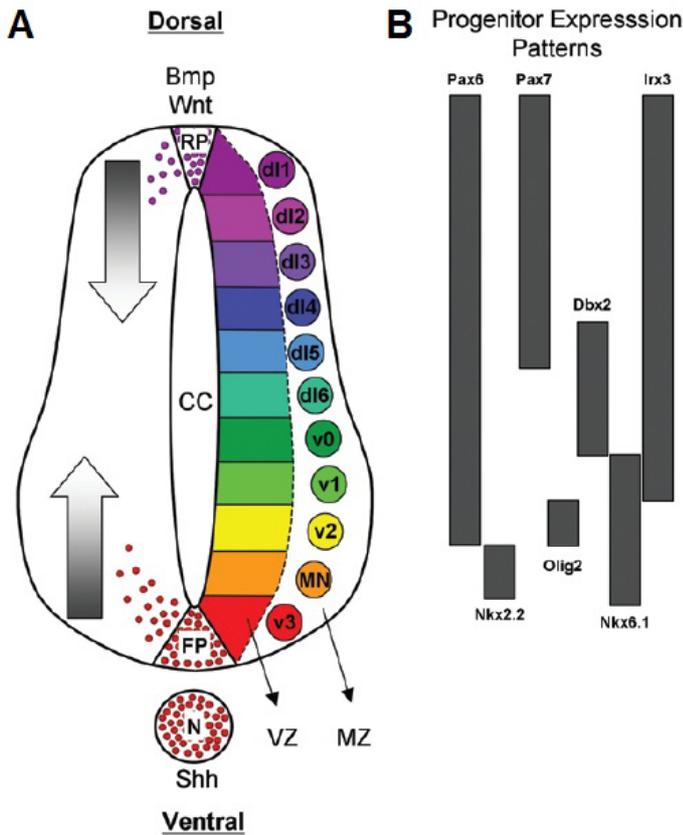


Figura 14: Esquema de una sección de la médula espinal. (A) Los neuroprogenitores proliferan desde una zona localizada medialmente y adyacente al canal central (CC) en una región conocida como zona ventricular (VZ). Las neuronas postmitóticas diferenciadas están localizadas lateralmente en una región conocida como la zona del manto (MZ). Distintos subtipos neuronales son generados desde diferentes dominios de progenitores colocados a lo largo de un eje dorso-ventral. Los dominios individuales de los diferentes progenitores están identificados por la expresión de diferentes combinaciones de factores de transcripción (mostrado en B). El patrón espacial de la expresión de factores de transcripción en los progenitores depende de la acción combinada de los gradientes de BMPs, Shh y Wnts. N, Notocorda; RP, roof plate; FP, floor plate. Adaptación: (Ulloa and Briscoe, 2007).

dorsales (Zechner et al., 2007).

Para dar explicación a estos hechos, un gradiente DV de Wnts, principalmente Wnt1 y Wnt3a, ha sido propuesto como organizador del crecimiento de los progenitores neurales (Megason and McMahon, 2002). Así, la expresión ectópica de Wnt1 induce un incremento en el número de células mitóticas en la médula espinal de embriones de ratón (Dickinson et al., 1994). Consistente con esto, la expresión de β -catenina constitutivamente activa, en embriones de ratón o de pollo, incrementa la proliferación y disminuye la diferenciación, en contraste con la sobreexpresión de un dominante negativo para Tcf-4 o con la deficiencia de β -catenina (Megason and McMahon, 2002; Zechner et al., 2003; Ille et al., 2007).

para conocer los mecanismos de acción de los morfógenos. El “patterning” dorso-ventral (DV) del tubo neural está dictado principalmente por las proteínas Shh, BMPs, FGFs y Wnts (Ulloa and Briscoe, 2007; Ulloa and Marti, 2010) (Figura 14).

Muchas proteínas Wnt están expresadas en, o adyacentes a, el tubo neural en desarrollo (Parr et al., 1993; Hollyday et al., 1995), entre ellos, Wnt1 y Wnt3a, que se expresan ambos en regiones dorsales del tubo neural, han centrado la atención en el desarrollo del eje DV inhibiendo la vía de señalización Shh/Gli3 (Alvarez-Medina et al., 2008). Así, embriones de ratón mutantes para Wnt1 y Wnt3a presentan una pérdida o disminución de los tipos celulares característicos del tubo neural dorsal (Muroyama et al., 2002). Además, tanto la pérdida como la ganancia de función de β -catenina en progenitores neurales conllevan a una regulación en la expresión de Olig3, proteína crítica para la especificación de diferentes subtipos neuronales

2.4.3.- Desarrollo del neocórtex

Las neuronas de la placa cortical se originan desde la zona ventricular (VZ), que actúa como una zona de precursores multipotentes, que a través de divisiones simétricas y/o asimétricas dan lugar a neuronas post-mitóticas (Caviness and Takahashi, 1995; Kriegstein et al., 2006). Numerosas evidencias señalan un papel importante de la señalización por Wnt en la regulación de la proliferación, salida del ciclo celular y neurogénesis en la VZ del neocórtex en desarrollo (Chenn, 2008; Ivaniutsin et al., 2009) (Figura 15).

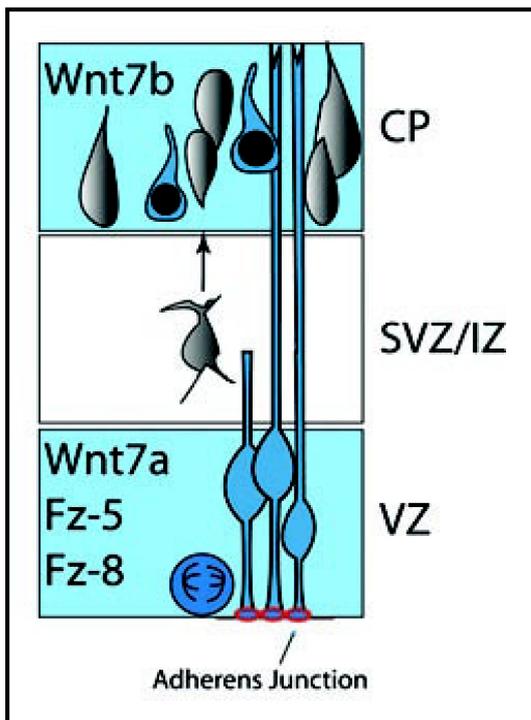


Figura 15: **Expresión de Wnts, Fzs y actividad de Wnt en el córtex cerebral en desarrollo.** Los precursores neurales residen en la zona ventricular (VZ), y se trata de células neuroepiteliales polarizadas unidas por el extremo apical por uniones adherentes ricas en β -catenina (rojo). La glía radial puede dividirse asimétricamente originando precursores intermedios localizados en la zona subventricular o zona intermedia (SVZ/IZ) que a través de una división simétrica darán lugar a 2 neuronas post-mitóticas que se situarán en la placa cortical (CP) (neurogénesis indirecta). Otros precursores neuronales también pueden originar neuronas postmitóticas a través de divisiones simétricas terminales y/o asimétricas (neurogénesis directa). Wnt7a, Fz5 y Fz8 se expresan en la VZ, mientras que Wnt7b lo hace en la CP. La actividad Wnt/ β -catenina está localizada en la VZ y CP (azul). Adaptación: (Chenn, 2008).

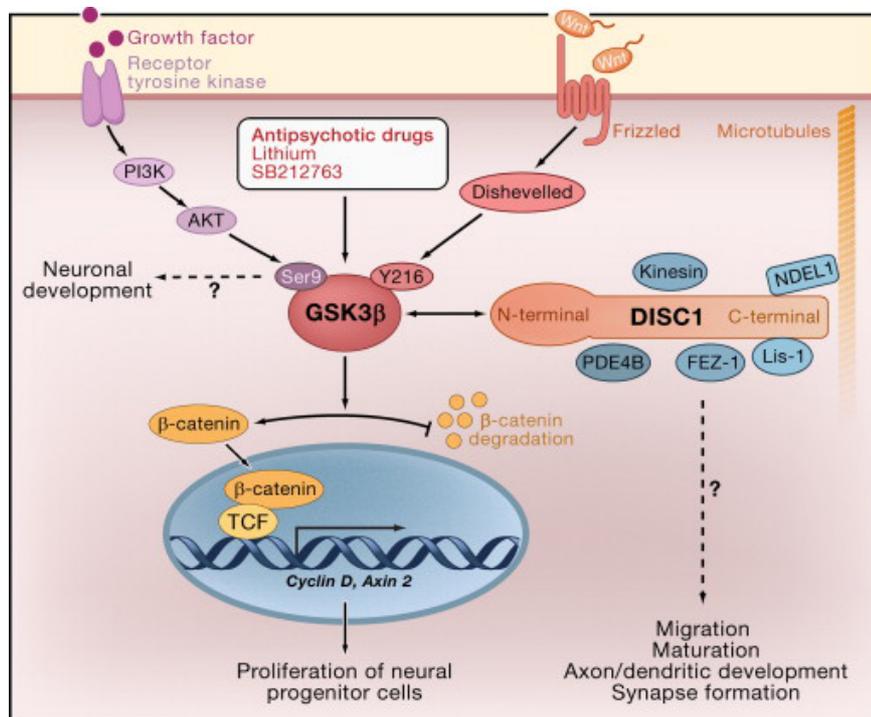
La sobreexpresión de β -catenina constitutivamente activa en la VZ, usando un promotor de nestina, produce una expansión masiva del córtex cerebral (Chenn and Walsh, 2002), lo que ocurre de manera similar con una proteína de fusión β -catenina-Lef1 que también activa los genes diana de la vía canónica (Machon et al., 2007), indicando un papel para esta vía de Wnt manteniendo el estado proliferativo de los precursores neurales y aumentando su número, posiblemente a través de la expresión de genes como N-myc (Kuwahara et al., 2010). Los ensayos con una pérdida de función selectiva de β -catenina en la VZ también indican un papel de Wnts en el desarrollo cortical (Woodhead et al., 2006). En conjunto, estos estudios de ganancia y pérdida de función sugieren un papel importante de la vía canónica en el desarrollo radial del córtex cerebral manteniendo el fenotipo de progenitor neural, pero no está claro si este efecto es específico de la señalización por Wnt o es debido a una vía de β -catenina, independiente de Wnt, en las uniones adherentes (Noles and Chenn, 2007; Zhang et al., 2010c).

Además, mientras que la vía de Wnt es fuerte en la VZ y es inmediatamente regulada a la baja tras la salida de las células a la SVZ/IZ (Mutch et al., 2010), una pequeña parte de las neuronas inmaduras que llegan a la placa cortical reinician una fuerte señalización canónica de Wnt, regulando su diferenciación (Hirabayashi et al., 2004; Israsena et al., 2004). Este

activación de la vía canónica parece producirse ya tempranamente en los progenitores intermedios favoreciendo la diferenciación en neuronas (Munji et al., 2011). Uno de los primeros estudios describiendo un posible papel de la vía canónica en las decisiones de destino celular, es descrito en ratones mutantes para LRP6 que presentan una capa cortical mucho más delgada que en ratones salvajes (Zhou et al., 2006). De forma similar, la sobreexpresión de β -catenina retrasa la maduración de la glía radial en progenitores intermedios mostrando una reducción de las capas superiores de la corteza cerebral (Wrobel et al., 2007). Recientes estudios destacan un posible papel del receptor de Wnt Ryk, que a través de un procesamiento proteolítico específico, actuaría como un importante regulador de la diferenciación neuronal (Lyu et al., 2008).

La kinasa GSK3, es un regulador principal de varias vías de señalización incluyendo la vía de Wnt/ β -catenina y también juega un papel muy importante en desarrollo neural a varios niveles (Hur and Zhou, 2010), incluyendo el desarrollo del neocórtex donde se ha visto juega un papel fundamental. Así, el ratón doble knock-out para GSK3 α y GSK3 β presenta fenotipos similares a los causados por una sobreexpresión de β -catenina incrementando proliferación y disminuyendo diferenciación (Kim et al., 2009). Estas evidencias se ven reforzadas por un estudio que postula un papel de DISC1 regulando los niveles de β -catenina a través de la inhibición de GSK3 β y por lo tanto regulando la proliferación de los progenitores neuronales (Mao et al., 2009) (Figura 16). Ambos estudios refuerzan el papel de la vía canónica de Wnt en el desarrollo de la corteza cerebral donde GSK3 tendría un papel principal.

Figura 16: Regulación de la neurogénesis por DISC1. El modelo muestra como DISC1 puede regular diferentes etapas en la neurogénesis en el cerebro embrionario de ratón. DISC1 inhibe GSK3 β a través de su dominio N-terminal, que da lugar a la estabilización de β -catenina y a la activación de factores de transcripción. Estos factores promoverán la proliferación de los progenitores neuronales, previniendo su salida prematura del ciclo celular y la diferenciación neuronal. Un candidato de actuar "up-stream" de GSK3 β es la vía de señalización de Wnt, que regula la autofosforilación de GSK3 β en la tirosina 216 (Y216). La actividad de GSK3 β esta también



regulada por la fosforilación en el residuo serina 9 (Ser9) por la vía del receptor tirosina quinasa (RTK)-PI3K-AKT. Drogas antipsicóticas, como litio o SB212763 alteran la actividad de GSK3 β por diferentes mecanismos. DISC1 también interacciona con otras proteínas, incluyendo NDEL1 (NudeE-like 1), Lis-1 (lissencephaly-1), PDE4B, FEZ1 y kinesina. Adaptación: (Ming and Song, 2009).

2.4.4.- Polaridad neuronal

Las neuronas maduras están compartimentalizadas en dos dominios distintos morfológica y funcionalmente, con múltiples dendritas recibiendo e integrando los inputs sinápticos y con un axón liberando los neurotransmisores en las terminales presinápticas. Esta compartimentalización es regulada por el proceso de la polaridad neuronal, donde diversos factores extracelulares se han visto implicados, entre ellos, varias vías de señalización no-canónicas de Wnt (Yang and Luo, 2010).

Los complejos formados por las proteínas Par3, Par6 (partitioning defective) y PKC atípica (aPKC) han sido descritos por su papel regulando la división celular asimétrica y la polaridad celular (Ohno, 2001; McCaffrey and Macara, 2009), así como el desarrollo del axón en mamíferos (Shi et al., 2003; Nishimura et al., 2004). En cultivos de neuronas hipocampales, aPKC está directamente regulada por Dvl y Wnt5a. La interacción de Dvl con la aPKC conlleva a una estabilización y activación de esta última promoviendo la diferenciación del axón. Consistente con este modelo, la sobreexpresión o el silenciamiento de Dvl1 induce o inhibe, respectivamente, la formación de axones (Zhang et al., 2007).

La GTPasa pequeña Cdc42 se ha visto esencial promoviendo la polaridad neuronal *in vitro* e *in vivo*, probablemente actuando “down-stream” de Rap1 (Schwamborn and Puschel, 2004; Garvalov et al., 2007). Estas proteínas se ha visto están implicadas en la polarización neuronal regulando el complejo Par3/Par6/aPKC (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000) y también han sido implicadas en la regulación de la gastrulación a través de Wnt (Veeman et al., 2003a; Tsai et al., 2007), lo que refuerza el papel de la vía Wnt/Cdc42/aPKC regulando la polaridad neuronal (Zhang et al., 2007) donde el silenciamiento de Cdc42 previene la diferenciación axonal inducida por Dvl.

Varios estudios también evidencian el papel de la proteína GSK3 β como un importante regulador de la polaridad neuronal. La forma inactiva de GSK3 β está localizada en el extremo de cada neurita antes de la polarización, pero cuando las neuronas comienzan a polarizar, esta forma inactiva únicamente permanece concentrada en el terminal axónico, lo cual sugiere que la inactivación de GSK3 β en el axón en desarrollo es crucial para la polarización (Shi et al., 2004; Jiang et al., 2005; Yoshimura et al., 2005; Gartner et al., 2006). Así, la inhibición o silenciamiento de GSK3 β induce la formación de múltiples axones, mientras que la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa previene la formación del axón (Jiang et al., 2005). Además, la inhibición local de GSK3 β en neuronas ya polarizadas puede convertir un proceso dendrítico en axones (Jiang et al., 2005).

Muchos de los sustratos de GSK3 β están implicados en la polarización neuronal a través de la regulación de la dinámica de los microtúbulos tales como CRMP2 (collapsin response mediator protein 2) (Inagaki et al., 2001; Yoshimura et al., 2005), APC (Zumbrunn et al., 2001; Shi et al., 2004; Votin et al., 2005; Barth et al., 2008; Yokota et al., 2009), MAP1B

(microtubule-associated protein 1B) (Trivedi et al., 2005) o Tau (Stoothoff and Johnson, 2005). MARK2 (microtubule affinity-regulating kinase 2), otra kinasa que regula la fosforilación de varios sustratos implicados en la dinámica de los microtúbulos, también se ha visto implicada en la regulación de la polarización neuronal en células de neuroblastoma y neuronas hipocampales, regulando la fosforilación de Tau (Biernat et al., 2002; Chen et al., 2006b).

El papel de las vías de señalización de Wnt/Dvl, en la regulación de la dinámica de los microtúbulos a través de GSK3 β (Lucas et al., 1998; Krylova et al., 2000) y de MARK2 (Terabayashi et al., 2007; Zhang et al., 2007), ha sido ampliamente demostrado. Así, MARK2 regula la polarización neuronal a través de la vía Wnt/Par3/Par6/aPKC (Zhang et al., 2007). Por su parte, GSK3 β también se ha descrito implicada en la regulación de la migración y polaridad celular a través de esta vía de señalización (Etienne-Manneville and Hall, 2003; Schlessinger et al., 2007), sin embargo, y a pesar de las numerosas evidencias que parecen señalar un posible papel de Wnt/GSK3 β /MT en polaridad neuronal, esta vía de transducción todavía no es completamente comprendida, pues la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de GSK3 β no tiene efectos en la inducción del crecimiento axonal inducida por Dvl (Zhang et al., 2007) y futuros estudios serán necesarios.

2.4.5.- Guía axonal y crecimiento neurítico

Normalmente, los axones de las neuronas deben navegar largas distancias para encontrar su área objetivo y luego buscar su diana post-sináptica específica para crear sinapsis funcionales. Las proteínas Wnt, se ha demostrado actúan como moléculas guía en algunos de estos procesos (Zou, 2004; Endo and Rubin, 2007).

Estudios en la médula espinal muestran que la vía de señalización de Wnt, controla la dirección del crecimiento axonal en el eje anterior-posterior (A-P). Wnt4 y Wnt7b están expresados en un gradiente A-P en la línea media ventral y actúan atrayendo los axones comisurales anteriormente después de cruzar la línea media (Imondi and Thomas, 2003; Lyuksyutova et al., 2003) (Figura 17). Este efecto atrayente está posiblemente mediado a través de Fz3, pues los axones comisurales de ratones mutantes para este receptor, crecen en una dirección aleatoria, mostrando también defectos en los axones talamocorticales, corticotalámicos y nigroestriados (Wang et al., 2002; Bovolenta et al., 2006). Esta vía de señalización actuaría a través de la aPKC para ejercer su efecto atrayente en los axones comisurales (Wolf et al., 2008).

Otras dos proteínas Wnt, Wnt1 y Wnt5a, están también expresadas en un gradiente A-P en la parte dorsal de la médula espinal en ratones neonatales, y actúan repeliendo los axones de los tractos corticoespinales para que crezcan en sentido posterior (Dickson, 2005; Liu et al., 2005b) (Figura 17). Una vez estos axones han cruzado la línea media y han entrado en la

médula espinal rostral, comienzan a responder a Wnts, siendo mediado este efecto repulsivo a través del receptor Ryk.

El receptor Ryk también es responsable de mediar la actividad repulsiva de Wnt5a en los axones que han cruzado la línea media en el cuerpo calloso y, en ratones deficientes para este receptor, los axones no pueden salir del cuerpo calloso una vez han alcanzado el lado contralateral (Keeble and Cooper, 2006; Keeble et al., 2006). Ryk, no solo regula la acción repulsiva de Wnt5a conjuntamente con los receptores Frizzled, sino que también es responsable de mediar el crecimiento de los axones corticales (Li et al., 2009; Li et al., 2010). En ambos casos la vía de señalización de Ca^{2+} parece ser la responsable de traducir esta señal (Hutchins et al., 2011).

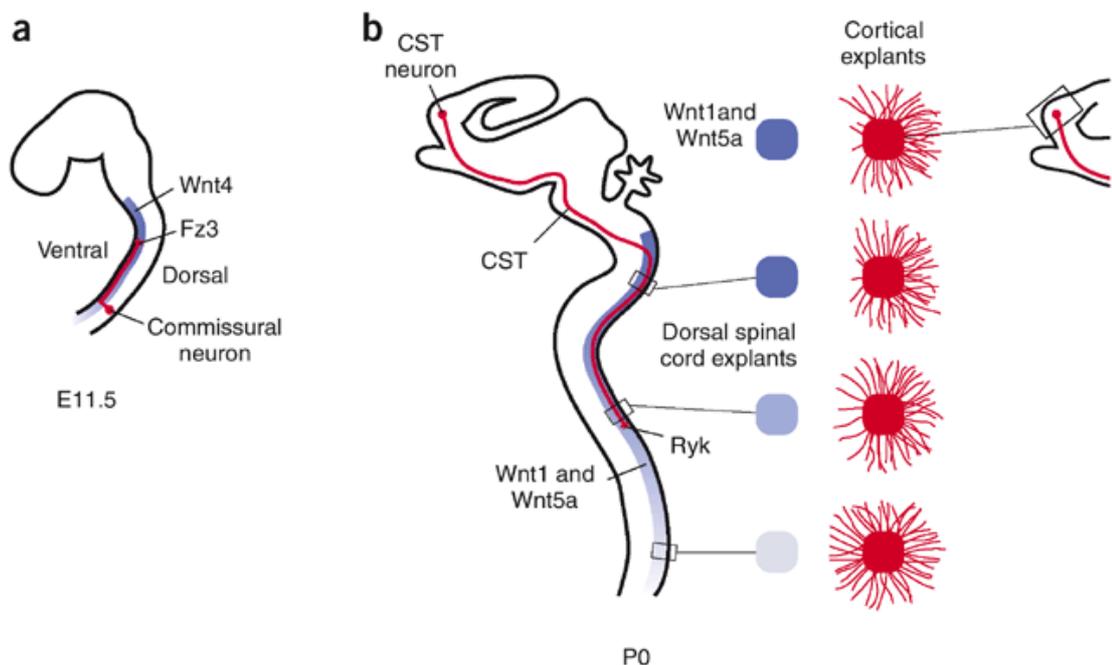


Figura 17: **Las proteínas Wnts guían los axones en la médula espinal anterior y posteriormente.** (a) Los axones comisurales giran anteriormente después de cruzar la placa del suelo. Este giro parece estar mediado en parte por Wnt4, y posiblemente otros Wnts, que están expresados en un gradiente A-P y traducen una señal atractiva a través de Fz3. (b) Después de atravesar el cerebro medio y posterior, los axones de los tractos corticoespinales cruzan la línea media y crecen posteriormente en el funículo dorsal. Este crecimiento parece estar mediado en parte por Wnt1 y Wnt5a que están expresados en un gradiente A-P en la médula espinal dorsal y median la señal repulsiva a través de Ryk. Adaptación: (Dickson, 2005).

Las proteínas Wnt también modulan el comportamiento axonal actuando sobre la remodelación del terminal axónico, incrementando el tamaño y complejidad del cono axonal e incrementando el diámetro y la ramificación del axón. Por ejemplo, Wnt7a funcionaría como una señal retrograda que regularía la remodelación axonal previa a la sinaptogénesis en el cerebelo (Lucas and Salinas, 1997; Hall et al., 2000), mientras que Wnt3 lo haría regulando la arborización terminal de las neuronas sensitivas en la médula espinal (Krylova et al., 2002).

Las vías de señalización de Wnt también están implicadas en la regulación de la morfogénesis dendrítica. Cultivos hipocámpales tratados con medio condicionado con Wnt7b (Rosso et al., 2005) o Wnt2a (Wayman et al., 2006) exhiben dendritas más largas y con más ramificaciones. La vía de señalización Wnt/PCP a través de su efector JNK (Rosso et al., 2005) y una vía independiente de β -catenina, a través de la interacción con N-cadherina y α -catenina (Yu and Malenka, 2003), median este efecto sobre el desarrollo dendrítico. Estos estudios además demuestran que la actividad neuronal regula el crecimiento dendrítico a través de la modulación de la expresión o liberación de las proteínas Wnt (Yu and Malenka, 2003; Wayman et al., 2006).

2.4.6.- Sinaptogénesis en el SNC

Una vez los axones hacen contacto con su diana se forman las sinapsis, un proceso que requiere la comunicación entre las células pre- y postsinápticas y en el cual las proteínas Wnt también se han visto implicadas (Burden, 2000; Salinas, 2005; Speese and Budnik, 2007; Farias et al., 2010; Budnik and Salinas, 2011). Así, Wnt7a es expresado por las células granulares del cerebelo durante la sinaptogénesis de las fibras musgosas, incrementando la acumulación de sinapsina I (Figura 18), y ratones mutantes para Wnt7a (Hall et al., 2000) o dobles mutantes para Wnt7a y Dvl1 (Ahmad-Annur et al., 2006) presentan defectos, en la formación de las sinapsis, manifestado por una disminución en la acumulación de proteínas presinápticas. Estos defectos son mayores en los ratones doble mutantes, lo cual indica un papel de Dvl1 en la formación de estas sinapsis. Wnts también regulan la formación de la sinapsis en otras áreas como la medula espinal. Así Wnt3, que es expresado en las neuronas motoras cuando forman sinapsis con las sensoriales, incrementan la acumulación de sinapsina I en estas últimas (Krylova et al., 2002).

La regulación de este proceso tendría lugar a través de la vía Wnt/GSK3 β /MT, que se ha postulado actuaría de forma independiente de la transcripción (Budnik and Salinas, 2011). Esto es debido a que la inhibición de GSK3 β copia el efecto de Wnts *in vitro* (Hall et al., 2002) y a que las proteínas Wnts incrementan la proporción de conos axonales con microtúbulos “rizados” (Purro et al., 2008), que están asociados a conos que pueden formar una sinapsis. Los receptores Frizzleds, también estarían implicados en este proceso, ya que su sobreexpresión o inhibición en el hipocampo incrementa o disminuye, respectivamente, el número de lugares presinápticos (Varela-Nallar et al., 2009; Sahores et al., 2010).

Otros Wnts, como Wnt5a, actuarían en las terminales postsinápticas, activando vías no canónicas a través de los receptores Ror (Paganoni et al., 2010) o actuando a través de la vía de JNK y favoreciendo la acumulación de PSD95 en células hipocámpales (Farias et al., 2009). Además, Wnt5a también favorecería la formación de sinapsis inhibitorias incrementando la retención de los receptores GABA_A (Cuitino et al., 2010), lo que podría

indicar un papel de Wnts en la formación de todo tipo de sinapsis.

En neuronas maduras, la actividad neuronal juega un papel muy importante en los procesos de plasticidad sináptica modulando número, morfología y eficiencia de las sinapsis. Numerosas son las evidencias de un papel de Wnts regulando este proceso (Chen et al., 2006a; Wayman et al., 2006; Ataman et al., 2008; Gogolla et al., 2009; Sahores et al., 2010; Varela-Nallar et al., 2010; Cerpa et al., 2011; Ciani et al., 2011). Además, las proteínas Wnts también han sido descritas modulando la transmisión sináptica (Ahmad-Annur et al., 2006; Beaumont et al., 2007; Cerpa et al., 2008; Avila et al., 2010), lo que refuerza un papel de las vías de señalización de Wnt regulando la actividad neuronal en el sistema nervioso central.

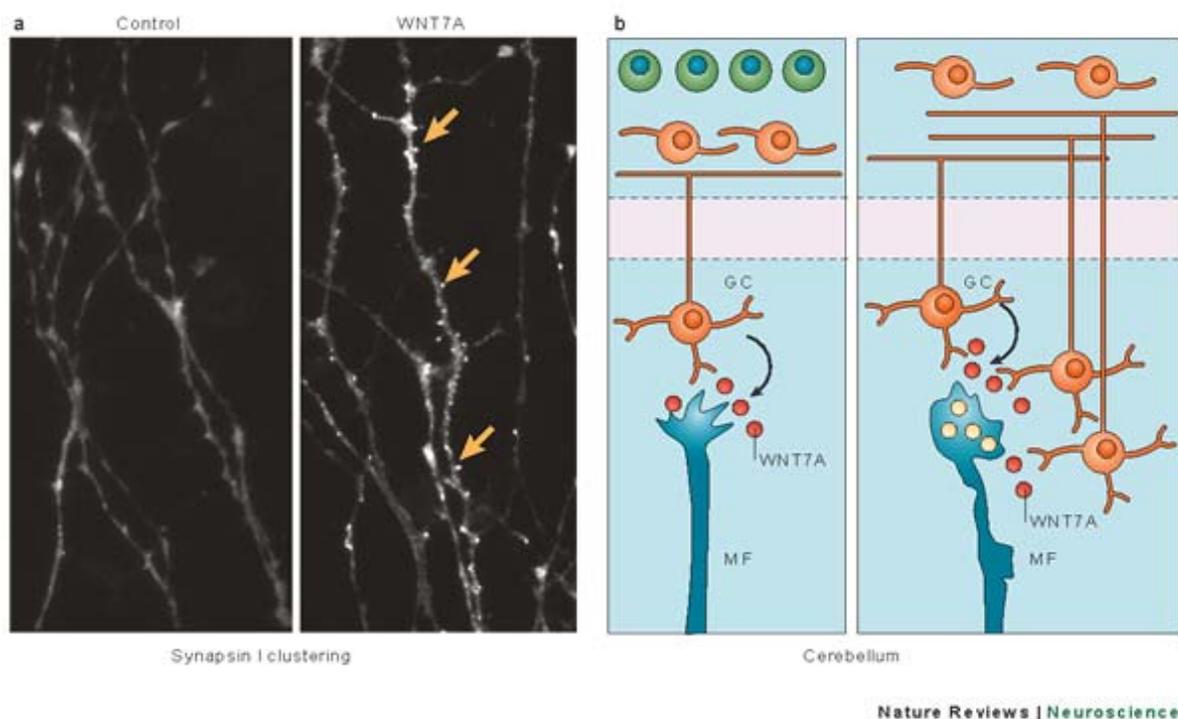


Figura 18: **Wnts regulan la formación de las sinapsis centrales.** (a) Wnt7a incrementa la acumulación de sinapsina I y conlleva a un incremento en el número de lugares sinápticos. (b) En el cerebelo, Wnt7a es expresado por las células granulares (GC, naranjas) pero no por sus progenitores (verdes), que están localizados en las áreas más externas de la corteza cerebelar. En estadios tempranos, Wnt7a puede actuar en las fibras musgosas (MF, turquesas) induciendo su remodelación (panel de la izquierda). En estadios más tardíos, Wnt7a induce la acumulación de proteínas presinápticas (amarillo) en los axones de las fibras musgosas (panel de la derecha). Adaptación: (Ciani and Salinas, 2005).

2.4.7.- Alteraciones de las vías

Las vías de señalización asociadas a Wnt juegan un papel muy importante en procesos de desarrollo y maduración (ver más arriba). No es de extrañar que defectos en Wnts, o proteínas relacionadas, conllevan a severas alteraciones del sistema nervioso, muchas de las cuales han sido relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, incluyendo Alzheimer,

Parkinson, autismo, desorden bipolar o esquizofrenia (Kaytor and Orr, 2002; Clevers, 2006; De Ferrari and Moon, 2006; Inestrosa and Toledo, 2008; MacDonald et al., 2009; Rawal et al., 2009; Freese et al., 2010; Okerlund and Cheyette, 2011).

Mutaciones en estas vías también han sido descritas por alterar el balance de la renovación tisular y causar una variedad de enfermedades incluyendo cáncer (Polakis, 2000; Caricasole et al., 2005). La implicación de la vía de Wnt/ β -catenina en el cáncer colorectal ha sido una de las más estudiadas y mutaciones en APC o β -catenina, que causan una activación constitutiva de esta vía, promueven una proliferación celular incontrolada (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Burgess et al., 2011). Además, la desregulación en las vías de Wnt también han sido asociadas con cánceres en otros tipos de tejidos, tales como el sistema nervioso (Blanc et al., 2005), próstata (Kharraishvili et al., 2011), corteza adrenal (El Wakil and Lalli, 2011) o hígado (Fatima et al., 2011).

En conjunto, los datos hasta ahora ofrecidos muestran la relevancia de estas vías de señalización y la importancia de su estudio, pudiéndose convertir en posibles dianas terapéuticas para enfermedades tan importantes como el cáncer o la enfermedad de Alzheimer.

3.- La familia de genes Armcx

3.1.- Evolución génica

Los genes Armcx pertenecen a una misma familia caracterizada por la posesión de dominios armadillo en su secuencia y por estar localizada en el cromosoma X (Armadillo repeat containing X-linked). Proteínas con estos dominios se han implicado en procesos de tumorigénesis, desarrollo embrionario o mantenimiento de la integridad tisular (Hatzfeld, 1999).

El primer miembro descrito en esta familia fue identificado en un estudio de dos híbridos que usaba como cebo la proteasa del peroxisoma P110 (Kurochkin et al., 2001). Debido a la posesión de los dominios armadillos y a que su expresión se encuentra perdida o significativamente reducida en ciertos tipos de carcinoma, esta proteína fue llamada Alex1 (Armadillo containing protein lost in epithelial cancers on chromosome X). En este estudio también se describieron las proteínas Alex2 y Alex3 que presentaban una alta homología con Alex1. Basados en este estudio, en la homología de sus secuencias que sugieren la presencia de dominios armadillo, y en la localización de su gen en el cromosoma X, se nombraron oficialmente un total de 6 genes (Armxcx 1-6), todos ellos situados en una misma región de 2,3 Mb (Xq22.1-Xq22.2) (Winter and Ponting, 2005).

Esta región del cromosoma X contiene 3 familias de genes con secuencias codificantes divergentes: Bexs (Brain expressed X-linked), Wex (Wwbp5-like X-linked), y una tercera familia denominada Gasp (G-protein-coupled receptor-associated sorting protein) en la que están incluidos los miembros Armcx. La evolución de estas 3 familias resulta de especial interés, pues esta región del cromosoma X es exclusiva de los mamíferos placentarios, no encontrándose ningún homólogo fuera de este clado. Los genes de las 3 familias, se habrían originado por numerosos eventos de conversión génica a partir de un ancestro común. Prueba de ello, los genes Bex, Wex y Gasp, poseen una misma estructura génica con la secuencia codificante para la proteína localizada en un único exón y compartiendo una secuencia conservada no codificante de 57 bases en la región 5' UTR llamada BGW. Tras estos procesos de duplicación las 3 familias habrían sufrido una rápida divergencia de sus secuencias, lo que podría estar ligado a una innovación en fisiología o comportamiento (Winter and Ponting, 2005).

La familia Gasp, fue descrita originalmente debido a homologías en las secuencias con el gen Gasp1, y en ella se incluyeron un total de 10 genes (Gasp 1-10) (Simonin et al., 2004). Actualmente los nombres oficiales de los miembros de esta familia son Gprasp1 y Gprasp2, Bhlhb9, Armcx 1-6 y el gen Armc10. Todos ellos, a excepción de Armc10, se encuentran localizados en la región Xq22.1-Xq22.2 (Tabla 2).

Nombre Oficial	Sinónimos	Cromosoma (Región) <i>Homo sapiens</i>	Gene ID
Armc10	Gasp8, SVH	7(q22.1)	83787
Armc10-like ^b	Gasp8 isoforma 5	3	100510677
Armcx1	Gasp7, Alex1	X(q22.1-q22.2)	51309
Armcx2	Gasp9, Alex2	X(q22.1-q22.2)	9823
Armcx3	Gasp6, Alex3	X(q22.1-q22.2)	51566
Armcx4	Gasp4	X(q22.1-q22.2)	100131755
Armcx5	Gasp5	X(q22.1-q22.2)	64860
Armcx6	Gasp10	X(q22.1-q22.2)	54470
Armcx6-like	Gasp10Ψ	X(q22.1-q22.2)	653354
Gprasp1 ^a	Gasp1, Per1	X(q22.1-q22.2)	9737
Gprasp2 ^a	Gasp2	X(q22.1-q22.2)	114928
Bhlhb9	Gasp3, p60TRP	X(q22.1-q22.2)	80823

Tabla 2: **Familia de los genes Armcx**: nombre oficial, sinónimos, cromosoma y región y Gene ID.

^a El nombre oficial actualmente según HUGO -Human Genome Organization- Gene Nomenclature comitee son Gprasp1 y Gprasp2 debido a posibles confusiones con el gen de *Drosophila* Gasp.

^b La secuencia de Armc10-like ha sido deducida a partir del análisis de la secuencia del cromosoma 3.

Adaptación: (Abu-Helo and Simonin, 2010).

Además, en base a la presencia de una secuencia de 15 aa altamente conservada y repetida en algunos de los genes Gasp, se subdividió ésta en 2 subfamilias: Gasp 1-5 que presentan esta repetición y Gasp 6-10 que no la presentan (Abu-Helo and Simonin, 2010).

Junto a estos genes también se encuentra un pseudogen de Armcx6 (Armcx6-like), que esta colocado “up-stream” de Armcx6 en el cromosoma X. Aunque este pseudogen no codifica para ninguna proteína funcional, podría estar actuando como una copia redundante para facilitar los procesos de conversión génica de su vecino Armcx6 (Winter and Ponting, 2005).

En la familia de genes Gasp, además de los que se encuentran en la región Xq22.1-Xq22.2, también se incluyó el gen Armc10 (Gasp8) localizado en el cromosoma 7 en humanos (Tabla 2) y cuya estructura génica contiene 7 exones que codifican para la proteína (Simonin et al., 2004; Abu-Helo and Simonin, 2010). 4 variantes por *splicing* fueron descritas originalmente para el gen armc10 (Huang et al., 2003) donde fue relacionado con las

proteínas Alex 1-3. Debido a que una de estas variantes podía estar implicada en hepatocarcinogénesis fueron denominadas SvH A, -B, -C, -D (splicing variants involved in hepatocarcinogenesis).

El gen *Armc10-like*, que se encuentra en el cromosoma 3 en humanos, también fue incluido en esta familia (Tabla 2). Su estructura génica está formada por un único exón codificante y su secuencia es idéntica a *Armc10* excepto porque ha perdido dos pequeñas secuencias de 34 y 25 aminoácidos correspondientes al exón 2 y 6 de *Armc10* respectivamente (Simonin et al., 2004; Abu-Helo and Simonin, 2010).

Los genes que se encuentran en Xq22.1-Xq22.2 no tienen ningún gen parálogo fuera de esta región a excepción de *Armc10* y *Armc10-like*. Tampoco se han encontrado genes ortólogos en animales que no fueran mamíferos euterios, a excepción de una secuencia homóloga a *Armcx6* en *Danio rerio* (pez cebra), llamada *Armcx6l* (*Armcx6 H. sapiens* like), lo que ha hecho suponer que estas familias de genes se habrían originado a partir de una duplicación de *Armcx6* en una etapa temprana de la divergencia de los vertebrados (Winter and Ponting, 2005).

3.2.- Patrón de expresión y localización subcelular

Los genes *Armcx* (de aquí en adelante nos referiremos a los genes *Armcx* para hablar de los genes *Armcx* 1-6, *Gprasp1-2* y *Bhlhb9* localizados todos en la región Xq22.1-Xq22.2) presentan un patrón de expresión casi ubicuo (Kurochkin et al., 2001; Simonin et al., 2004) y algunos trabajos remarcan su localización en el sistema urogenital, donde *Armcx2* presenta una elevada expresión durante el desarrollo de los testículos mientras que esta muy reducida en el desarrollo de los ovarios (Smith et al., 2005) o la expresión de *Armcx3* que se encuentra enriquecida en segmento inicial del epidídimo (Hsia and Cornwall, 2004).

Sin embargo, es en el cerebro donde se encuentra la mayor expresión de estos genes. Esto también ocurre para los genes *Bex* y *Wex* de la región Xq22.1-Xq22.2, lo que ha hecho sugerir que estas 3 familias exclusivas de los mamíferos euterios puedan estar implicadas en la adaptación evolutiva del neocórtex, una región del cerebro anterior exclusiva de los mamíferos (Winter and Ponting, 2005).

La distribución subcelular de los genes *Armcx* ha sido estudiada en varios modelos bien en células transfectadas o de manera endógena en células u órganos (Abu-Helo and Simonin, 2010). Muchos de ellos se encuentran en el citoplasma, como *Gprasp1* (Matsuki et al., 2001; Whistler et al., 2002; Bartlett et al., 2005; Kiyama et al., 2006; Martini et al., 2007; Tappe-Theodor et al., 2007), *Gprasp2* (Horn et al., 2006), *Bhlhb9* (Heese et al., 2004), *Armcx2* (Smith et al., 2005), *Armcx3* (Mou et al., 2009) y también la proteína *Armc10* (Pagliarini et al., 2008), en algunos casos asociados a estructuras de membrana como *Gprasp2*, *Armcx2* o mitocondrias como *Armcx3* y *Armc10*.

Algunos indicios también sitúan a estas proteínas en el interior del núcleo celular. Gprasp1, en presencia de la proteína Period1, es translocada al núcleo de células COS7 (Matsuki et al., 2001) y en células PC12, que expresan la proteína de manera endógena, una pequeña proporción que se encuentra de manera constitutiva en el núcleo sufre un incremento significativo tras un tratamiento de NGF (Kiyama et al., 2006). Gprasp2 fue identificado en una caracterización a gran escala de fosfoproteínas extraídas de la fracción nuclear de las células HELA (Beausoleil et al., 2004). Bhlhb9 unido a GFP o DsRed puede ser observado por inmunofluorescencia tanto en el citoplasma como en el núcleo de células CHO transfectadas con estos vectores (Heese et al., 2004). Estos indicios parecen indicar que algunos miembros de esta familia podrían ser actuar como mediadores entre ambos compartimentos bajo determinadas condiciones fisiológicas (Abu-Helo and Simonin, 2010).

3.3.- Función

3.3.1.- Regulación de receptores acoplados a proteína G

Poco se conoce acerca de la función de los genes *Armex*. La mayoría de evidencias acerca de la función de esta familia proviene de las interacciones de Gprasp1 con receptores acoplados a proteína G (GPCR), motivo por el cual se ha denominado a esta familia con el nombre de Gasp (GPCR associated sorting proteins) (Simonin et al., 2004). Los GPCR son uno de los grupos más importantes y diversos de receptores, cuya señalización y tráfico esta finamente regulada gracias a la participación de una gran variedad de proteínas interactoras (Ritter and Hall, 2009).

Hasta una treintena de GPCR han sido descritos como interactores de Gprasp1. Con varios de ellos se han encontrado evidencias de que Gprasp1 estaría implicada en su degradación mediante transporte a lisosomas (Figura 19) (Moser et al., 2010) como son con los receptores delta opioides (Whistler et al., 2002), los receptores de dopamina D2 (Bartlett et al., 2005) y D3 (Thompson and Whistler, 2011) y de cannabinoides CB1 (Martini et al., 2007; Tappe-Theodor et al., 2007) y GPR55 (Kargl et al., 2011) o bien modulando su señalización como es el caso del receptor US28 codificado por el citomegalovirus humano (Tschische et al., 2010).

Basados en estos estudios ratones knockout para Gprasp1 fueron generados. Estos ratones son viables y no muestran ninguna diferencia destacada frente a sus hermanos wild-type (WT) salvo un ligero descenso en la locomoción vertical (Boeuf et al., 2009). Con estos animales se ha demostrado que el desarrollo de la tolerancia a muchos de los efectos fisiológicos de los cannabinoides están significativamente reducidos en los ratones knockout frente a los WT (Martini et al., 2010), de forma similar varias respuestas comportamentales como la sensibilización locomotora o la auto-administración tras un tratamiento repetido de cocaína están atenuadas en estos ratones frente a los WT y en las que estaría implicado el

receptor de dopamina D2 (Boeuf et al., 2009; Thompson et al., 2010). Estas deficiencias en el comportamiento han sido asociadas con afecciones en la habilidad para adquirir y/o expresar tareas complejas relacionadas con el cuerpo estriado (Mathis et al., 2010).

Además de Gprasp1 otros miembros de la familia son capaces de interactuar con algunos GPCR. Las interacciones de Gprasp2 con los receptores de dopamina D2, los β -1 y β -2 adrenérgicos, de calcitonina o el receptor US28 también han sido descritas (Simonin et al., 2004; Thompson et al., 2007). También ha sido sugerida la interacción de Armcx1, Armcx5 y Bhlhb9 con algunos de estos receptores (Abu-Helo and Simonin, 2010).

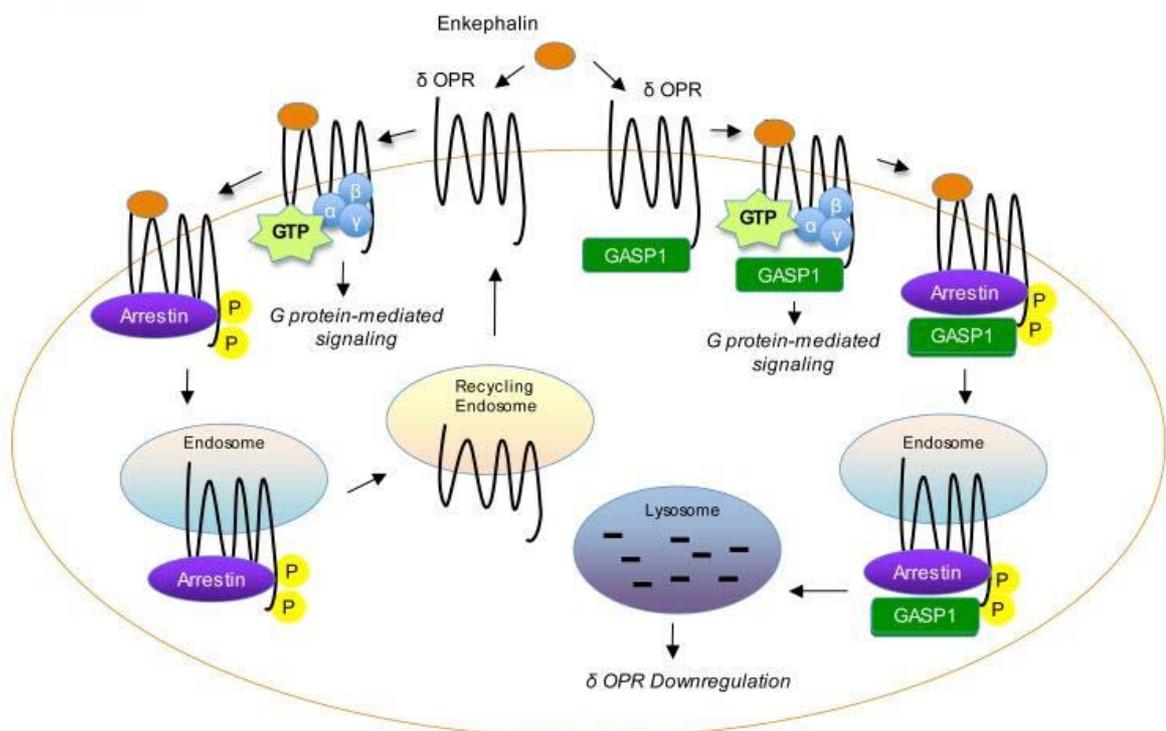


Figura 19: **Gprasp1 (Gasp1) regula el tráfico post-endocítico a lisosomas de los GPCRs.** Después de la estimulación por parte de un agonista los GPCRs son endocitados. Algunos de ellos son rápidamente reciclados hacia la membrana plasmática, mientras que otros son objetivo de una degradación proteolítica o lisosomal. Como se muestra en la figura la interacción entre Gprasp1 y el receptor δ -opioide (δ OPR) promueve la endocitosis y transporte a lisosomas del receptor δ -opioide tras su estimulación por un agonista. Adaptación: (Ritter and Hall, 2009).

3.3.2.- Regulación de la transcripción

La participación de los varios de los genes Armcx como moduladores de la transcripción también ha sido sugerida (Abu-Helo and Simonin, 2010). Varias evidencias indirectas sugieren que Gprasp1 podría estar participando en la transcripción de proteínas. Cuando fue descrito por primera vez, Gprasp1 era translocado al núcleo tras su co-expresión con Period1 (Matsuki et al., 2001). De forma similar un tratamiento de NGF produce el mismo cambio de localización en células PC12 (Kiyama et al., 2006). En este mismo trabajo, se postula que Gprasp1 podría jugar un papel en la supervivencia neuronal mediada por NGF,

actuando como un modulador de la transcripción, ya que cuando *Gprasp1* es regulada a la baja por medio de un RNA de interferencia, se observa una disminución del rescate frente apoptosis después de que células PC12 fueran tratadas con NGF.

Más evidencias hay para el gen *Bhlhb9* donde el silenciamiento mediante siRNAs en células ATDC5, que representan precursores de condrocito, produce una disminución en la expresión de varios genes importantes en la diferenciación de este tipo celular (Suwanwela et al., 2010). Estudios previos, aunque sin evidencias directas, ya sugerían que el gen *Bhlhb9*, debido a la posesión de dominios “basic helix-loop-helix” característicos de factores de transcripción, a su localización en el núcleo, así como que el silenciamiento de la proteína *Bhlhb9* disminuye la supervivencia de células PC12, podrían tener una implicación en la regulación de la transcripción, implicado en procesos de supervivencia y envejecimiento neuronal (Heese et al., 2004).

También se han encontrado evidencias de que *Armcx3* actúa modulando la transcripción interaccionando con *Sox10* (Mou et al., 2009). *Sox10* es capaz de transactivar a los promotores de los genes de las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ del receptor nicotínico de la Acetilcolina de manera específica según el tipo celular, activándolos únicamente en células neuronales, y *Armcx3* potencia la transactivación de estos genes mediante su interacción con *Sox10*. *Armcx3* es descrita como una proteína integral de la membrana mitocondrial externa y su sobreexpresión en células de tipo neuronal OBL21, aumenta la localización de *Sox10* alrededor de las mitocondrias, por lo que se sugiere que esta interacción, produciría un cambio post-translacional en *Sox10* que le permitirá transactivar a nuevos genes como las subunidades del receptor de Acetilcolina (Mou et al., 2009).

El gen *Armc10*, que no se encuentra en la región conservada del cromosoma X como los otros genes *Armcx*, presenta una alta homología en su secuencia por lo que su función puede estar relacionada con el resto de genes de la familia. La sobreexpresión de la subunidad B de *Armc10* está regulada al alza en hepatocarcinomas pero no así otras subunidades. La sobreexpresión de *Armc10-B* en células normales de hígado aumenta la proliferación mientras que su silenciamiento en células de hepatoma incrementa la apoptosis (Huang et al., 2003). *Armc10-B* estaría regulando la actividad transcripcional en estas células acelerando su crecimiento e inhibiendo su apoptosis mediante su interacción con la proteína p53 (Zhou et al., 2007).

3.4.- Implicación en enfermedades neurodegenerativas y cáncer

No existen muchos indicios acerca del papel de los genes *Armcx* en situaciones patológicas, pero la mayoría de trabajos hasta la actualidad los relacionan con enfermedades neurodegenerativas (lo que concuerda con su expresión predominante en el sistema nervioso) así como en cáncer.

En el caso de las enfermedades neurodegenerativas varios trabajos apuntan sobre variaciones en la expresión de los genes *Armcx* en condiciones patológicas. Así, la expresión del mensajero de *Bhlhb9* se encuentra significativamente reducida en el cerebro de pacientes con Alzheimer (Heese et al., 2004). Los genes *Armcx4* y *Gprasp2* se encuentran entre una lista de 892 genes prioritarios en el cerebro que están desregulados en pacientes con Parkinson (Moran and Graeber, 2008). Una variante génica de *Gprasp2*, con una alta probabilidad de causar una mutación, también fue encontrada en un estudio orientado a encontrar variantes que pudieran estar implicadas en esquizofrenia, realizado entre genes con potencial implicación en sinapsis y localizados en el cromosoma X (Piton et al., 2010).

Gprasp2 también ha sido identificada como un interactor, de Huntingtina, causante de la enfermedad de Huntington, aunque una posible contribución por parte de *Gprasp2* en la enfermedad no ha sido demostrada (Horn et al., 2006) mientras que otro estudio de dos híbridos muestra la posible interacción de *Gprasp1* y *Ataxina7* (una proteína implicada en ataxia espinocerebelar) y postula un posible papel de esta en el desarrollo de la enfermedad (Kahle et al., 2010). Finalmente, un reciente estudio con ratones sobreexpresantes de *Bhlhb9* muestra un papel de esta proteína modulando la fosforilación y procesamiento proteolítico de APP y mediando la supervivencia neuronal y sinaptogénesis, dando la posibilidad la vía de señalización asociada a *Bhlhb9* este implicada en la enfermedad de Alzheimer (Mishra et al., 2011).

También varias evidencias indican un posible papel de los genes *Armcx* en cáncer. *Armcx1* y *Armcx2* fueron descritos inicialmente por su implicación en cáncer al estar perdidos o significativamente reducidos en carcinomas (Kurochkin et al., 2001). *Armcx1* también se encuentra significativamente reducido en adenocarcinomas producidos por una alta actividad kinasa de c-Raf (Rohrbeck and Borlak, 2009) y su promotor ha sido confirmado como un potencial biomarcador en cáncer de ovario al encontrarse hipermetilado (Gloss et al., 2011). *Armcx2* esta regulado al alza en pacientes con el síndrome X-frágil, que presentan una menor tasa de incidencia en padecer cáncer, pudiendo actuar como potencial supresor tumorigénico (Rosales-Reynoso et al., 2010). *Gprasp1* ha sido detectado como un posible biomarcador del cáncer de mama (Tuszynski et al., 2011) y *Bhlhb9* también ha sido sugerido como supresor debido a que las islas CpG de su promotor se encuentran metiladas en varias líneas celulares de cáncer colorectal y tumores primarios, causando una reducción en su expresión (Jacinto et al., 2007).

En otros estudios, en cambio, algunos genes de la familia se relacionan con tumores que presentan una peor prognosis. *Armcx5*, *Gprasp2* y *Bhlhb9* presentaran una mayor expresión en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, en pacientes que presentan metastasis, frente a pacientes que no la han sufrido (Rickman et al., 2008) y *Armcx5* también es regulado al alza por *ZNF217*, descrito como oncogen en una amplia variedad de cánceres e indicativo de una mayor agresividad del tumor (Krig et al., 2007).

El gen *Armc10* también ha sido identificado como un posible oncogen pues esta regulado al alza en hepatocarcinomas, además, su sobreexpresión en líneas celulares de hígado promueve la proliferación y al ser inyectadas en ratones “nude” devienen tumores (Huang et al., 2003). Además, también se ha identificado colocalizando de forma única o altamente enriquecida con CD10 (una proteína fuertemente expresada en la mayoría de metástasis en nódulos linfáticos) en una línea celular de cáncer de próstata frente a un tejido control (Dall'Era et al., 2007).

3.5.- Alex3: Preliminares del proyecto

Durante el desarrollo del sistema nervioso central se deben coordinar de manera fina numerosos procesos celulares que aseguren su correcto funcionamiento. Así, se debe generar una enorme cantidad de tipos celulares diferentes en los lugares precisos y en los momentos adecuados, a la vez que se debe asegurar la formación de conexiones funcionales entre las diferentes regiones. Uno de estos procesos es la formación de la corteza cerebral.

La corteza cerebral corresponde a una estructura laminada, donde oleadas de células postmitóticas provenientes de una región interior, la zona ventricular (ZV), se van situando en la superficie de la pared cerebral y originan la preplaca (PP). Esta preplaca es posteriormente subdividida en la zona marginal (MZ) más exterior y situada en la superficie de la pared cerebral y la subplaca (SP), por debajo de la MZ, entre ambas se formara la placa cortical (PC). Oleadas de células provenientes de la zona ventricular atravesarán la subplaca y se situaran junto a la MZ engrosando la placa cortical. Subsiguientes oleadas se situaran por encima de las predecesoras originando un gradiente de “dentro-afuera”, de forma que las

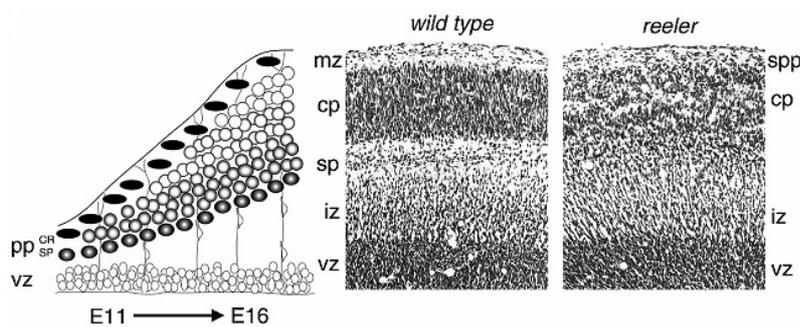


Figura 20: **Representación esquemática del desarrollo del neocórtex.** A partir de E11 aparece la preplaca (pp) por encima de la zona ventricular (vz). La primera oleada de células de la placa cortical (cp) migra a través de la subplaca (SP) y se detienen junto a las células de Cajal-Retzius (CR) de la zona marginal (mz). Sucesivas oleadas de células migran radialmente a través de sus predecesores deteniéndose de nuevo junto a las células de Cajal-Retzius formando un gradiente de dentro-fuera en el que las neuronas más jóvenes quedan situadas más cerca de la zona marginal. Adaptación: (Rice and Curran, 2001).

neuronas generadas en los primeros ciclos de división serán las que se localicen en las capas más internas de la corteza y las generadas posteriormente se establecerán en las más externas (Angevine and Sidman, 1961; Marin and Rubenstein, 2003)(Figura 20).

Un gran número de evidencias sugieren un papel importante de la MZ en los procesos de laminación y migración, especialmente de las células Cajal-Retzius que

la componen. La presencia y maduración de estas células es previa a la formación de la placa cortical y su ablación en ratones neonatos comporta una alteración de la migración de las neuronas (Super et al., 2000). Posteriormente se describió que estas células regulaban la migración proporcionando señales directoras de este proceso (Rice and Curran, 2001).

En la actualidad se conocen un importante número de moléculas implicadas en la formación de la corteza cerebral (reelina, dab1, cdk5/p35/p39, integrinas...). La ausencia o mutación de estas proteínas causan grandes anomalías morfológicas y/o patológicas en el sistema nervioso, por lo que la identificación y caracterización de estas moléculas presenta un gran interés neurobiológico.

Con el objetivo de identificar genes adicionales implicados en estos procesos se empleó en el laboratorio la técnica de hibridación sustractiva conocida como “Directional Tag PCR Substraction” (Usui et al., 1994). De esta forma se aislaron clones de cDNA procedentes de mRNA de rebanadas correspondientes a capas corticales altas (zona marginal y parte superior de la placa cortical) que fueron substraídos contra mRNA del córtex subyacente (zona ventricular, zona intermedia y parte inferior de la placa cortical) de embriones de ratón en estadio embrionario de E16 (Garcia-Frigola et al., 2004) (Figura 21). De entre los genes identificados, enriquecidos en las capas altas de la corteza cerebral, uno resultó codificar para la proteína Alex3 (Armxc3).

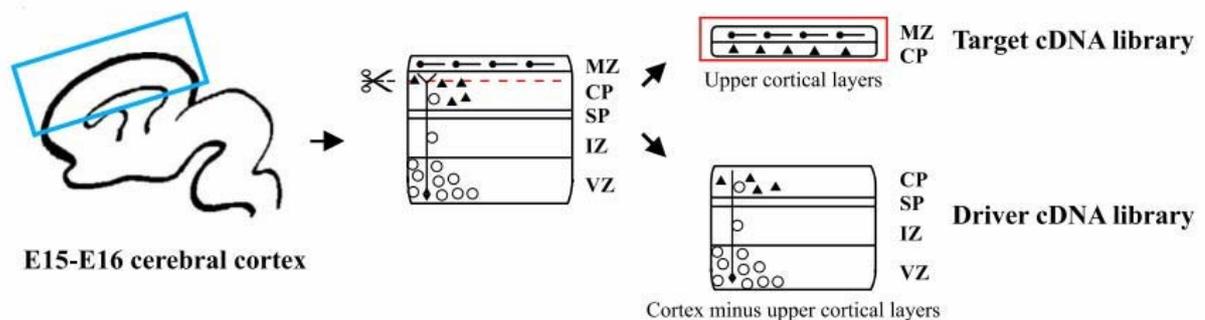


Figura 21: **Representación esquemática de la obtención de muestras usadas para la generación de las librerías Diana y Conductora.** La librería de cDNAs Diana se generó a partir de la capa I y zona superior de la placa cortical de ratones en estadio embrionario E16. La librería Conductora se generó con las capas restantes: zona inferior de la placa cortical, zona intermedia y zona ventricular. Adaptación: (Garcia-Frigola et al., 2004).

Alex3 es una proteína de 379 aminoácidos y 42 Kda de peso. Además de dos dominios armadillo completos y otros tres con menos homología, presenta un posible dominio transmembrana flanqueado por una putativa señal de localización en la membrana mitocondrial externa (Mou et al., 2009) en su extremo N-terminal, una señal de localización nuclear, así como potenciales lugares de fosforilación por caseína kinasa 2 (CK2), proteína kinasa C (PKC) y proteína kinasa dependiente de cAMP (PKA) (Pfam en <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam> y SMART en <http://smart.emblheidelberg.de>; confirmación de la NLS con PredictNLS) (Figura 22).

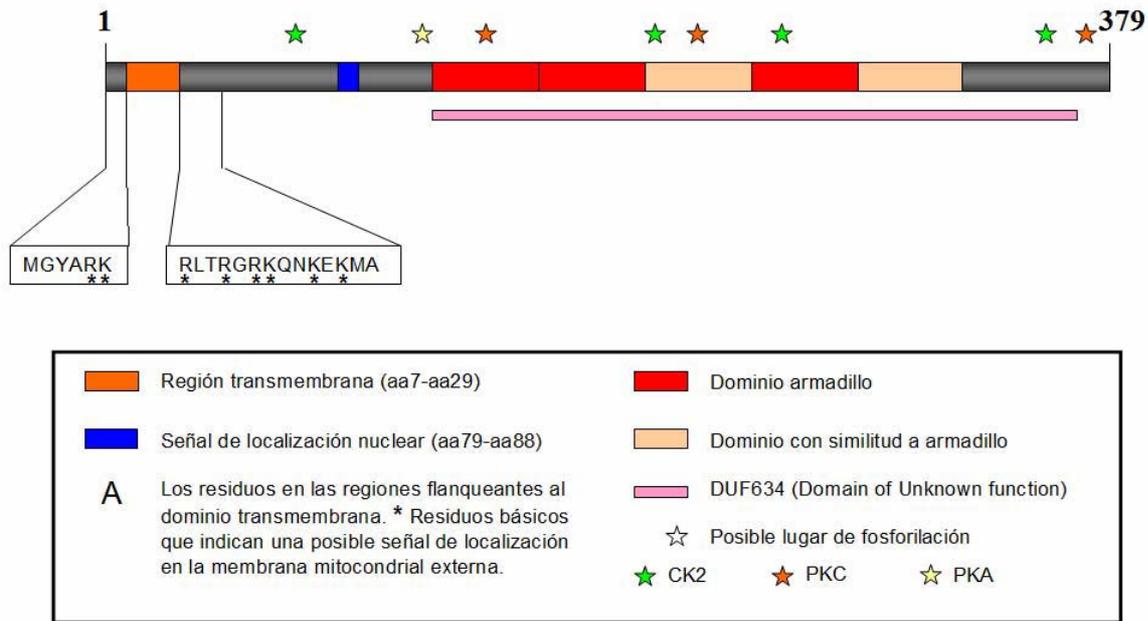


Figura 22: Representación esquemática de la proteína Alex3. Dominios anotados en base a la predicción en bases de datos como Pfam o SMART y referencias bibliográficas. Las estrellas marcan la posición de potenciales residuos de fosforilación en serina o treonina.

El patrón de expresión de Alex3 durante la ontogenia fue llevado a cabo en nuestro laboratorio (López-Domenech et al., en preparación) mediante estudios de hibridación in situ e inmunohistoquímica. Tanto el transcrito, como la proteína de Alex3 presentan niveles elevados en el sistema nervioso central desde etapas tempranas del desarrollo hasta el adulto.

En etapas primeras del desarrollo (E9-E12) la expresión del transcrito de Alex3, detectado en embriones enteros, es importante en vesícula óptica, médula espinal y la transición entre mesencéfalo y metencéfalo (Figura 23).

Estudios en profundidad en cortes de coronales cerebro desde E14 hasta Adulto, tanto para el transcrito como para la proteína, muestran una elevada expresión de Alex3 en varias regiones del cerebro, siendo especialmente relevante en estructuras laminadas como el córtex cerebral, hipocampo, bulbo olfativo y la capa de células Purkinje y granulares del cerebelo. La expresión tanto del transcrito como de la proteína de Alex3 disminuye a medida que progresa el desarrollo, manteniéndose significativa en estas estructuras. Destaca también la expresión de Alex3 en las zonas proliferativas como la zona ventricular en estadios embrionarios o la capa germinativa externa en estadios postnatales (López-Domenech et al., en preparación) (Figura 23).

El estudio detallado de la inmunohistoquímica mostró una localización intracelular diferencial de la proteína Alex3 en diferentes regiones del cerebro. La gran mayoría de regiones presentan durante todo el desarrollo una localización preferencialmente nuclear de Alex3, si bien existe una no despreciable presencia de la proteína en el resto de la célula. Por

otro lado y sólo a partir de estadios postnatales, puede apreciarse un cambio de localización de la proteína que pasa a estar muy enriquecida en el citoplasma en dos poblaciones neuronales muy concretas: las neuronas del núcleo hipotalámico lateral y las células de Purkinje. Esta marca en las células de Purkinje comienza a partir del estadio P10 y sólo se observa en una subpoblación de este tipo celular en un patrón en bandas parasagitales muy

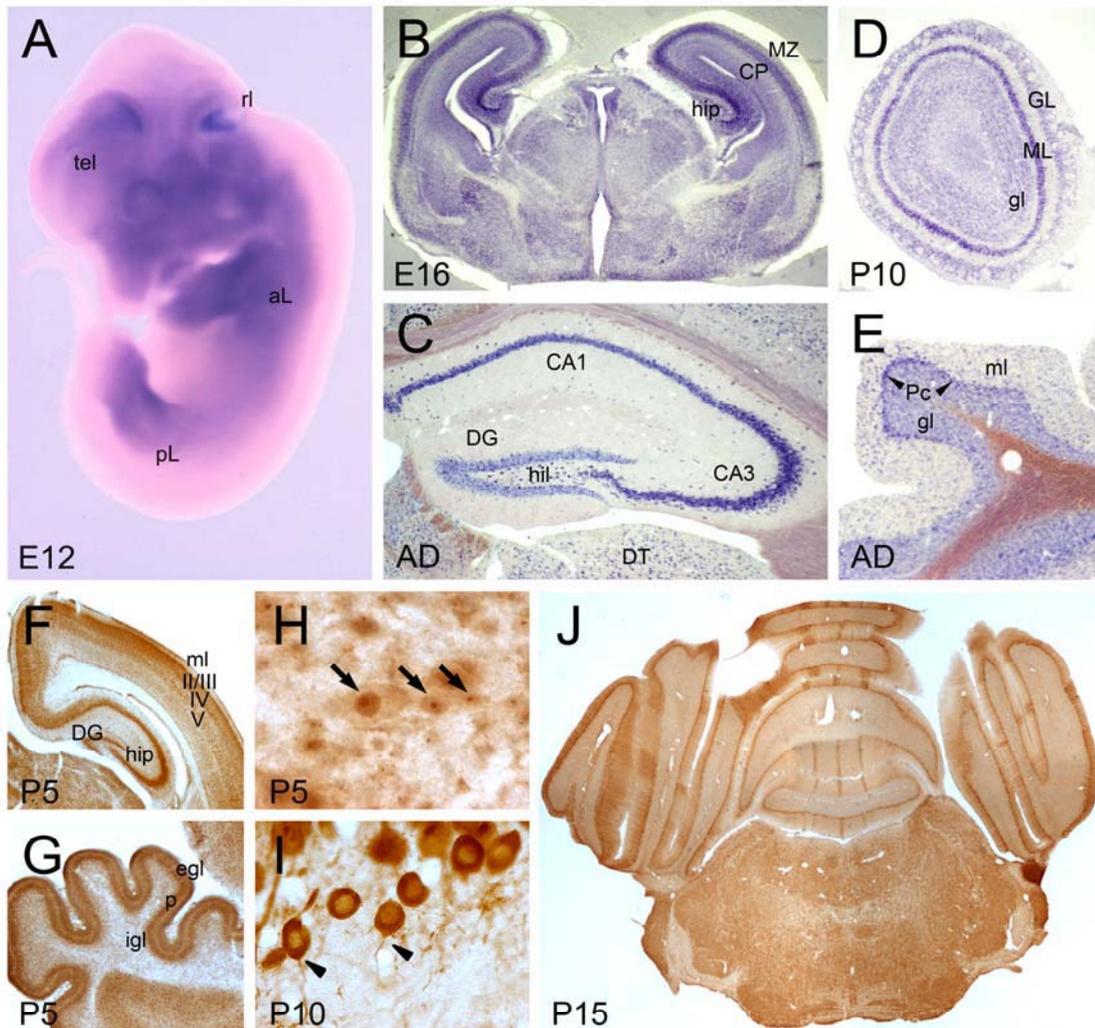


Figura 23: **Patrón de expresión del transcrito y de la proteína Alex3**. (A) La expresión de Alex3 en el estadio embrionario E12 se localiza predominantemente en el labio rómbico y en el telencéfalo, así como en las yemas de las extremidades en desarrollo. (B) Visión general de la expresión de Alex3 en E16. (C-E) Visiones seriadas de hipocampo, bulbo olfatorio y cerebelo. (F-J) Patrón de expresión de la proteína Alex3 en la región hipocámpal y en corteza cerebral (F) y cerebelo (G). (H) Detalle de un núcleo mesencefálico de un animal P5 en el que se observa el núcleo celular y en el que pueden apreciarse pequeños cuerpos de marca muy intensa (flechas). (I) Micrografía de gran aumento en el que se observan en detalle varias células de Purkinje de un animal P10 que presentan marca citoplasmática. Nótese el fino axón característico intensamente marcado (cabezas de flecha). (J) Visión panorámica de un cerebelo de animal P15 en el que se puede observar el característico patrón en bandas parasagitales (patrón tipo Zebrina II de la distribución de Alex3 en cerebelo). Abreviaciones: aL, extremidad anterior; CA1-CA3, tipos celulares piramidales del hipocampo; CP, placa cortical; DG, giro dentado; DT, tálamo dorsal; egl, capa granular externa; GL, capa glomerular; gl, capa granular; hil, hilus; hip, hipocampo; I-II-III-IV-V-VI, capas I a VI; igl, capa granular interna; ML, capa mitral; ml, capa molecular; MZ, zona molecular; p, células de Purkinje; Pc, capa de células de Purkinje; pL, extremidad posterior; rl, labio rómbico; tel, telencéfalo.

similar al que presenta la expresión de Zebrina II. La compartimentalización molecular que evidencia la expresión de zebrina II (y otros muchos marcadores) se supone que está determinada por una compartimentalización en módulos funcionales de circuitaje en el cerebelo y podría estar relacionada con su funcionamiento (Larouche and Hawkes, 2006; Pakan and Wylie, 2008) (Figura 23).

Los genes *Armcx* pertenecen a una familia génica que ha sido recientemente descrita (Simonin et al., 2004) y poco se conoce acerca de la función que desempeñan, sin embargo su elevada expresión en el sistema nervioso central, su participación en procesos del desarrollo embrionario y su posible implicación en tumorigénesis y enfermedades neurodegenerativas, los convierten en buenos candidatos para realizar un estudio en profundidad acerca de sus mecanismos bioquímicos y biológicos en los que pueden estar implicados. La proteína Alex3 (*Armcx3*) resultó ser un interesante candidato para estar implicada en algunos de los procesos del desarrollo de la corteza cerebral (neurogénesis, migración,...) y otras estructuras laminadas. Además, la localización en mitocondrias de Alex3 (Mou et al., 2009) y la posesión de dominios armadillo, similares a los de la proteína β -catenina, hacen de esta proteína un candidato para estar regulando procesos en la biología mitocondrial o en las vías de señalización de Wnt, donde β -catenina juega un papel fundamental (Peifer et al., 1991).

OBJETIVOS

El objetivo de esta Tesis Doctoral es el de caracterizar el papel funcional de la proteína Alex3 en la vía de señalización de Wnt y en la dinámica mitocondrial. La sucesión de resultados obtenidos durante la elaboración de la tesis se ha traducido en la concreción de los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Estudio de la evolución génica de la familia de proteínas Armcx en la que está incluida Alex3.

- Profundizar en el estudio de las proteínas relacionadas con Alex3 y su evolución génica
- Estudiar posibles similitudes entre las proteínas para conocer mejor su función

Objetivo 2: Análisis de la función de las proteínas Armcx, y concretamente Alex3 y Armc10, en la biología y dinámica mitocondrial

- Caracterizar el papel de Alex3 y Armc10 en la sobreexpresión en línea celular y su papel en la dinámica y función mitocondrial.
- Caracterizar el papel de Alex3 y Armc10 en la sobreexpresión y silenciamiento en cultivos neuronales y su papel en la dinámica y función mitocondrial.

Objetivo 3: Análisis del posible papel de las vías de señalización de Wnt en la regulación de Alex3 y su efecto en la dinámica mitocondrial

- Efecto de los factores Wnt en la agregación mitocondrial inducida por Alex3.
- Identificación del mecanismo de degradación de Alex3 en respuesta a estimulación por factores Wnt.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo acorde con las pautas aprobadas por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y siguiendo la Directiva del Concilio de la comunidad europea 86/609 EEC.

Análisis de DNA

Los análisis de las secuencias de DNA de los genes *Armxcx*, la traducción de proteínas y la localización en el cromosoma fueron llevadas a cabo buscando en las bases de datos públicas de genomas (www.ensembl.org, www.ncbi.nlm.nih.gov) y procesadas manualmente a través de análisis y blastN de bases de datos de EST en NCBI, tan bien como por comparación recíproca entre ortólogos de mamífero. La estructura de los dominios fue determinada por los software NCBI, Prosite, InterProScan, IPSort, HHPred y WolfSort. Los árboles filogenéticos fueron realizados por los métodos Bayesian usando MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck et al., 2001).

Vectores

Alex3 3'-UTR fue encontrado en una librería de Hibridación Substractiva (García-Frigola et al., 2004) y la secuencia completa fue obtenida por un screening en una librería de cDNA de un cerebro de ratón P0 (Stratagene). Para la generación de los vectores de expresión de *Alex3*, *Alex3-myc* y *GFP-Alex3Δ(1-12)*, pBluescript-*Alex3* fue subclonado en los vectores de expresión deseados: pcDNA.3 (Invitrogen), pSecTag-A (Invitrogen) y pEGFP-N3 y pEGFP-C1 (Clontech). Para la generación de *Alex3-GFP*, *Alex3ΔCt*, *Alex3(1-200)-GFP*, *Alex3(1-106)-GFP*, *Alex3(1-45)-GFP*, *Alex3(1-41)* y *Alex3(1-30)*, *Alex3* fue amplificado con una Pfu de alta fidelidad (Stratagene) y una diana de restricción BamHI fue introducida usando los primers adecuados (Forward: 5'-CTATAGGGCGAATTGGGTACCG-3'; y reverse: para *Alex3-GFP* 5'-GGATCCTTCCTGACTCTTTGGGAACATCC-3'; para *Alex3ΔCt-GFP* 5'-GGATCCAACATCCTTTCAGTCAGTT-3'; para *Alex3(1-200)-GFP* 5'-GGATCCAAGCCTGCGCTGATTTTCGG-3'; para *Alex3(1-106)-GFP* 5'-GGATCCCATCATCATCAGACCA-3'; para *Alex3(1-45)-GFP* 5'-GGATCCATCACCAGAGCCACCCTCA-3'; para *Alex3(1-41)-GFP* 5'-GGATCCCCAGAGCCACCCTCAGCCA-3' y para *Alex3(1-30)-GFP* 5'-GGATCCCTCAGCCATTTTCTCCTTG-3'). Todos los constructos generados fueron secuenciados con BigDye-Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Las secuencias shRNAi fueron diseñadas contra la secuencia mRNA de *Alex3* usando el software de diseño de primers siRNA v1.51 (Promega) y subclonados en el vector pVLTHM (Tronolab) a través de la digestión MluI/CLAI (New England Biolabs). La secuencia seleccionada para el shRNAi-*Alex3* fue 5'-cgcgtccccggctttaattgtcctaaattcaagagaatttaggacaattaaagccttttggaaat-3'; y la

secuencia scrambled shRNAi-control 5'-
 cgcgtccccgcagctttaattgctctgggtaataatattcatattaccagagcaattaaagctgcttttggaaat-3'. El vector de
 expresión Armc10-myc y las secuencias shRNAi para esta proteína fueron obtenidos de
 Origene (MR204310 y TG515187). La secuencia seleccionada para el shRNAi-Armc10 fue
 5'- tcatgatgtggatgtgaaagagaaagctttcaagagaagctttctctttcacatccacatcatgatttttg-3' y la secuencia
 scrambled shRNAi-control 5'-
 tgaccaccctgacctacggcgtgcagtgtcaagaggcactgcacgccgtaggtcaggggtggtcatttttg-3'. Para la
 generación de Armc10-GFP, la secuencia de Armc10 fue subclonada en el vector pEGFP-N3.

Los vectores de expresión Miro1-myc, Miro2-myc, Miro Miro1 Δ EF-myc, KIF1C-
 myc, y Trak2-myc fue como previamente describió (MacAskill et al., 2009a; MacAskill et al.,
 2009b). Miro1 shRNAi (V2MM_72258,
 TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCTGATTGCACTACTGAATTATAGTGAAGCCACAGAT
 GTA TAATTCAGTAGTGCAATCAGGATGCCTACTGCCTCGGA; y una secuencia control
 scrambled) fueron provistos por Josef Kittler (UCL, Londres). La Aequorina mitocondrial fue
 previamente descrita por (Manjarres et al., 2008). Mito-PAGFP fue descrito (Karbowski et al.,
 2004a). El DsRed mitocondrial (MitDsRed) fue una donación de Antonio Zorzano (IRB
 Barcelona). GST-Miro1 y GST-Miro Δ EF fueron donados por Josef Kittler (MacAskill et al.,
 2009b). pcDNA-Wnt1 y pcDNA- β -catenin S³³ fueron un regalo de Eduard Batlle (IRB
 Barcelona) y pcDNA-Fz2-HA, pcDNA-Wnt5a, pcDNA-Wnt11 y pcDNA-Dvl2 fueron
 donados por Paola Bovolenta (CBM, CSIC, Madrid).

Animales

Embriones y ratones postnatales OF1 (Iffra Credo, Lyon, Francia) fueron usados. La
 fecha de acoplamiento fue considerada como día embrionario 0 (E0) y el día de nacimiento el
 día postnatal 0 (P0). Los siguientes estadios de desarrollo fueron estudiados: E9, E10, E11,
 E12, E16, P6 P21 y Adulto. Los animales fueron anestesiados con 4% de halotano previo al
 sacrificio.

Hibridación in situ

Embriones y ratones postnatales fueron fijados con 4% paraformaldehído. Los
 cerebros fueron crioprottegidos, congelados y cortados en secciones coronales de 50 μ m de
 grosor. La hibridación in situ fue realizada en secciones flotantes como describe (Garcia-
 Frigola et al., 2004; Viturera et al., 2005) usando ribopuebas marcadas con digoxigenina
 (Roche) transcritas del cDNA de Alex3. La digoxigenina fue inmunodetectada y desarrollada

con los sustratos de fosfatasa alcalina NBT y BCIP (Invitrogen). Las hibridaciones in situ “whole mount” fueron realizadas en embriones E9 a E12, que fueron fijados, deshidratados y rehidratados en diluciones seriadas de metanol (25-100%), y permeabilizados con 10 µg/µl Proteínasa K, esencialmente como describe (García-Frigola et al., 2004). La hibridación e inmunodetección fueron realizados como se describe arriba.

Anticuerpos

Los anticuerpos policlonales contra Alex3 fueron generados por inyección de conejos con un péptido sintético de la proteína (369-LTERMFPKSQE-379).

Cultivo celular y transfección

Células HEK293AD o T fueron usadas para todos los experimentos. Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 2mM glutamina, 120 µg/ml Penicilina y 200 µg/ml Estreptomina y fueron mantenidos a 37°C en presencia de 5% CO₂. Cuando alcanzaban confluencia, las células fueron tripsinizadas (0.25% w/v) y plaqueadas a la densidad deseada. Después de 2 días, las células fueron transfectadas usando Fugene6 (Roche Diagnostics), siguiendo las instrucciones del fabricante, y usando un ratio de DNA 1:1 cuando 2 constructos fueron transfectados. Para los análisis de inmunoprecipitación, un vector vacío fue usado para balancear el DNA transfectado cuando era necesario. Las células fueron procesadas como corresponde entre 24-36h después de la transfección.

Cerebros de ratón E16 fueron diseccionados en PBS conteniendo 0.6% glucosa y los hipocampos fueron diseccionados. Después de tratamientos con tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA) y DNaseI (Roche Diagnostics), las piezas de tejido fueron disociadas mediante un suave pipeteo. Las células fueron entonces contadas y sembradas en cubres coatinizados con 0.5 mg/ml poly-L-lisina (Sigma-Aldrich) (para inmunocitoquímica) o en placas de 35-mm *Fluorodish* (World Precision Instruments, Inc) para live-imaging en medio neurobasal (Gibco) con 2mM glutamax, 120 µg/ml Penicilina, 200 µg/ml Estreptomina y suplemento B27 (Invitrogen, Carlsbad, CA), y fueron mantenidas a 37°C en presencia de 5% CO₂. Las células fueron cultivadas entre 7 y 15 días. La transfección de las neuronas fue llevada a cabo entre 10-12 DIV para experimentos de inmunocitoquímica y a 4 DIV para live-imaging, usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, y usando un ratio de DNA 1:3 DNA cuando dos constructos eran necesarios. Las células fueron procesadas 24-48 h después de la transfección. La extensión y la ramificación de las neuritas

fue analizado como describe (Vitureira et al., 2010) en 3 grupos experimentales (GFP-control, Alex3-GFP/m-Cherry y shRNAi-Alex3).

Tratamiento con inhibidores farmacológicos

Wnt3a recombinante de ratón fue usado a 200 o 400 ng/ml, Wnt5a recombinante de ratón fue usado a 400 o 800 ng/ml (R&D Systems), LiCl y SB216763 (Sigma Aldrich) fueron usados como inhibidores de GSK3 β a 10 mM y 10 μ M respectivamente, MG-132 (Merck-Calbiochem) fue usado como inhibidor del proteosoma a 10 μ M, SP600125 (Sigma-Aldrich) fue usado como un inhibidor de Jun-kinasa a 10 μ M, KN62 (Bioscience) fue usado como un inhibidor de CAMKII a 25 μ M, Cypermetrina (Biogen) fue usado como inhibidor de Calcineurina a 10 μ M, Casein kinasa II inhibitor I (Merck-Calbiochem) fue usado como un inhibidor de CK2 a 100 μ M, Calphostin C (Merck-Calbiochem) fue usado como inhibidor de PKC a 1 μ M y BAPTA/AM (Merck-Calbiochem) fue usado como un quelante de calcio intracelular a 20 μ M. Estas drogas y reactivos fueron usados 4 h después de la transfección. TPA (Merck-Calbiochem) fue usado como un activador de PKC a 1 μ M 19 h después de la transfección. 24 h después de la transfección todas las células fueron fijadas o lisadas para inmunocitoquímica o WB respectivamente.

Inmunocitoquímica

Células HEK293 o neuronas fueron fijadas en 4% paraformaldehído. Después de la fijación, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 en PBS y bloqueadas con buffer de bloqueo (10% FBS, 0,2 M glicina, 0,1% Tritón X-100 y 0,05% deoxicolato en PBS-0,2% gelatina) por 1 h a temperatura ambiente. Para marcar las células, los siguientes anticuerpos o marcadores fueron usados: rabbit anti-Alex3 (1:300, HEK293AD) (1:100, neuronas), rabbit anti-Armc10 (1:250, Sigma Aldrich), rabbit anti-GFP (1:500, Invitrogen), mouse anti-myc (1:500, Santa Cruz), mouse anti- β -catenin (1:500, Beckton Dickinson) y Phalloidin-TRITC (1:1000, Sigma-Aldrich) en buffer de bloqueo por 2 horas y con los correspondientes anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos (Alexafluor 546 o 488, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los núcleos fueron marcados con el marcador específico Hoechst-33342. Cuando era necesario, el marcaje de las mitocondrias fue llevado a cabo con el marcador selectivo, MitoTracker Orange CM-H2TMRos (1:2000, Molecular Probes, Invitrogen) en medio de cultivo por 30 minutos a 37°C previo a la fijación celular. Todas las muestras fueron luego montadas en Mowiol.

Microscopia electrónica

La microscopia electrónica de transmisión fue realizada en células HEK293AD o neuronas con el constructo de expresión Alex3 o un vector vacío como control. Las células fueron crecidas en cubres de cristal por 24h después de la transfección y fijadas con 2.5% glutaraldehído en 0,12 M buffer fosfato (PB). Luego fueron post-fijadas con 1% tetróxido de osmio, deshidratadas en acetona y embebidas en Epon. Secciones ultrafinas fueron obtenidas con un ultramicrotomo (Leica Ultracut UC6, Viena, Austria) y recogidas en rejillas formvar coatinizadas. Las secciones fueron marcadas con 2% acetato de uranilo. La inmunodetección de Alex3 fue llevada a cabo en las mismos cultivos. Las células fueron fijadas con 1% glutaraldehído-1% paraformaldehído en 0,12 M PB y lavadas 3 veces con 50mM glicina en 0,12 M PB. Las células fueron luego embebidas en 12% gelatina y embebidas con 2,3 M sacarosa. Los cubres fueron congelados en nitrógeno líquido y las criosecciones fueron hechas en el ultra criomicrotomo (Leica EM Ultracut UC6/FC6, Viena, Austria). Secciones ultrafinas fueron recogidas en 2% metilcelulosa – 2,3 M sacarosa e incubadas en 2% gelatina en PBS por 20 minutos. Las células fueron luego secuencialmente bloqueadas en 50 mM glicina por 15 minutos, 10% FBS por 10 minutos y 5% FBS por 5 minutos. Luego fueron incubadas con el anticuerpo Alex3 (1:100) en una solución con PBS con 5% FBS. Repeticiones de lavados fueron realizadas y Proteína A acoplada a partículas 10nm de oro (Cell Microscopy Center, Department of Cell Biology, University Medical Center Utrecht, Holanda) fueron añadidas a la solución de incubación en una dilución de 1:60. Repeticiones de lavados en PBS y agua destilada fueron realizadas previas a la observación. En los experimentos control, el anticuerpo primario anti-Alex3 fue omitido. No hubo marcaje de inmunogold en estas condiciones. Neuronas hipocampales transfectadas con Alex3GFP (6 DIV) fueron inmunomarcadas con anticuerpos anti-GFP y procesadas con una reacción de HRP. Después del desarrollo con DAB, las muestras fueron osmificadas, embebidas en Araldita y seccionadas en un ultramicrotomo. Secciones ultrafinas fueron marcadas con citrato de plomo. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio Tecnai Spirit (FEI, Holanda). Las micrografías fueron obtenidas con una cámara CCD SIS Megaview III.

Live Imaging y cuantificación del transporte axonal de mitocondrias

Células HEK293AD y neuronas hipocampales fueron sembradas en placas *Fluorodish* (World Precision Instruments, Inc) coatinizadas con Poly-L-lisina y transfectadas con Alex3-GFP, MitDsRed o Mito-PAGFP y filmadas 24 a 48 horas después de la transfección usando un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems) equipado con un objetivo de inmersión en aceite a 63x. Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C usando un calentador insertado en el microscopio y una cámara de incubación permitiendo la circulación de un

mezcla de aire caliente con CO₂ (5%) controlado para el control del pH. Para la agregación mitocondrial en células HEK293AD transfectados, series de imágenes en lapsos de tiempo compuestas por 10 imágenes (512x512 px) fueron tomadas cada 5 minutos durante 6 horas usando Leica Confocal Software (Leica Microsystems). Las películas fueron generadas a 10 fotogramas por segundo. Para los análisis de fusión mitocondrial en células HEK293T, series de imágenes en snack a lo largo del tiempo fueron compuestas de 7 imágenes (512x512 px) y fueron tomadas cada 6 segundos durante 15 minutos. Las películas fueron generadas a 7 fotogramas por segundo. Para la medición del transporte axonal de mitocondrias, los procesos axonales en neuronas transfectadas fueron identificados siguiendo un criterio morfológico, y la direccionalidad fue determinada para cada axón. Las mitocondrias axonales fueron captadas con un zoom digital adicional de 1.7x. Stacks de series de imágenes en lapsos de tiempo compuestas de 5 imágenes (512x512 px) fueron tomadas cada 6 segundos durante 15 minutos. Las 151 imágenes obtenidas fueron procesadas principalmente con Leica Confocal Software. El resto de procesamiento de imágenes, análisis, compilación de los videos (10 fotogramas por segundo) y edición fue hecho con el software de ImageJ software (versión 1.43K, NIH, USA). Las quimografías fueron generadas con el Software de MetaMorph (Molecular Devices - MDS Analytical Technologies). En experimentos de sobreexpresión, 42 axones fueron captados y analizados para cada condición, mientras que en experimentos de silenciamiento 22 axones por grupo fueron grabados. En todos los casos las mitocondrias fueron consideradas móviles cuando estas se movían más de 0,5 μm durante 1 minuto de grabación. Las distancias y velocidades del transporte retrógrado y anterógrado fueron medidas separadamente a partir de las quimografías correspondientes, como previamente describe (De Vos and Sheetz, 2007) y ningún plugging de trazado fue usado. El Software de ImageJ fue usado para cuantificar la longitud mitocondrial. El primer fotograma de cada video fue digitalmente procesado y marcado el umbral (usando el algoritmo de Yi), y la distancia más larga entre 2 puntos a través del límite de la selección (Feret's parameter) fue medido para todas las mitocondrias. Para asegurarse la relevancia entre axones, independientemente del número de mitocondrias que poseían, una media de longitud fue calculada para cada neurona y luego la media fue calculada entre axones.

Extractos de proteína y Western Blot

Células HEK293AD fueron obtenidas y lisadas en Laemmli Buffer (LB) a 98°C por 5 min. Los extractos de cerebro fueron obtenidos por homogenización en lisis buffer (50 mM HEPES; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 10% glicerol; 1% Tritón X-100; cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics GmbH), 1 mM NaF, 0.5 M sodio pirofosfato y 200 mM ortovanadato). 20 μg de proteína para cada muestra fue cargado y corrido en geles de poliacrilamida a 100 V. Las transferencias en membranas de nitrocelulosa fueron llevadas a

cabo en 120 mM glicina, 125 mM Tris, 0.1% SDS, y 20% metanol a 35 V o.n. Las membranas fueron entonces bloqueadas en leche en polvo al 5% en TBS e incubadas con anticuerpos primarios anti-Alex3 (1:2000), anti-Armc10 (1:1000, Sigma-Aldrich), anti-GFP (1:1000, Invitrogen), anti-myc (1:2000, Santa Cruz Biotechnologies), anti-KHC (1:1000, Millipore), anti- β -catenina (1:1000, Beckton Dickinson) o anti-HA (1:1000, Invitrogen). Anti-actina (1:1000, Chemicon, Temecula, CA) o β -tubulina (1:50.000, Atom) fueron usados como control de carga. Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP fueron usados en diluciones 1:2500 en TBS conteniendo 5% de leche en polvo. El marcaje fue visualizado con ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech).

Inmunoprecipitación

Células HEK293AD fueron lisadas usando un buffer que contenía 50 mM Tris-HCl pH7.5; 150 mM NaCl; 1.5mM MgCl₂; 5 mM EDTA; 1% Tritón-100; 10% glicerol; cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics GmbH); 1 mM NaF; 0.5 M sodio pirofosfato y 200 mM ortovanadato. 500 μ g de proteína total por muestra fue usado para cada ensayo de inmunoprecipitación. Los homogenados fueron incubados con anti-GFP (1:500, Invitrogen), anti-myc (1:500, Santa Cruz Biotechnology), a 4°C o.n. Todos los ensayos fueron realizados usando bolas de proteína G-Sefarosa (Sigma-Aldrich) por 2 h a 4°C. En los ensayos realizados en presencia de Ca²⁺, EDTA y EGTA fueron omitidos del lisis buffer y el Ca²⁺ fue añadido a una concentración final de 2 mM. Después de la incubación con la proteína G-Sefarosa, las muestras fueron lavadas 5 veces en buffer de lavado (10 mM Tris-HCl pH8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Tritón X-100, 0.5% NP-40) en el que el EDTA y EGTA fueron sustituidos de nuevo por 2 mM Ca²⁺ cuando era necesario. LB fue añadido a las bolas y fueron hervidas a 98°C por 5 min. Las proteínas fueron luego analizadas por SDS-PAGE y WB.

GST pull-down

Proteínas fusionadas a GST (GST-Miro1; GST-Miro1 Δ EF) fueron producidas en *E. coli* y purificadas como describió previamente (Kittler et al., 2006). Los lisados de cerebro (cerebro adulto) fueron solubilizados en un buffer que contenía 50mM HEPES, 125 mM NaCl, 1% Tritón, 2 mM EDTA, 3mM EGTA, 1 mM PMSF, y antipaina, pepstatina y leupeptina a 10 mg/ml. Las proteínas fusionadas a GST acopladas a las bolas de Sefarosa (30 μ g) fueron expuestas a 20 mg de lisado de cerebro con concentraciones variantes de [Ca²⁺]. El material unido fue lavado 5 veces en el buffer descrito arriba previo a la elución con el buffer con SDS. Los WB fueron llevados como se ha descrito arriba.

Determinación de los parámetros bio-energéticos y el manejo de Ca²⁺

Para la cuantificación del número de copias de mtDNA, el DNA total fue extraído usando el minikit QIamp DNA (QiAgen, GmbH, Alemania). El contenido de mtDNA humano (células HEK293) fue medido por el método de realtime PCR usando el sistema de Real Time PCR de Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) como describe (Andreu et al., 2009). La cantidad de mtDNA fue corregida por medición simultánea de una copia única del gen RNase P nuclear. El número de copias de mtDNA en las neuronas de ratón fue realizado mediante el análisis de 2 genes mitocondriales (Rnr2 y Nd4), y por motivos de normalización, una copia única del gen Ang1 nuclear fue también analizado. Los ensayos fueron realizados usando el sistema de Real Time PCR ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Para el gen Rnr2, el mtDNA fue amplificado entre las posiciones nucleotídicas 2470 y 2542 con el primer forward 5'-AATGGTTCGTTTGTTC AACGATT-3'; primer reverse: 5'-AGAAACCGACCTGGATTGCTC-3'; prueba: 5'-6FAM-AAGTCCTACGTGATCTGAGTTMGB-3'. Para el gene Nd4, el mtDNA fue amplificado entre las posiciones de nucleótidos 11060 y 11151 con el primer forward: 5'-TGCATCAATCATAATCCAACTCCATGA-3'; primer reverse: 5'-GGCAGAATAGGAGTGATGATGTGA-3'; prueba: 5'-6FAM-CCATGTGCGATTATTAG-MGB-3'. El número de copias de Ang1 fue analizado usando un ensayo de expresión del gen prediseñado Taqman MGB Mm00833184_s1 (que detecta el DNA genómico, como si la diana estuviese enteramente localizada entre el exón 2 de ang1). Las curvas de calibración obtenidas a partir de plásmidos que contenían 1 copia de las secuencias diana fueron usadas para calcular el número de copias absoluto de mtDNA y nDNA. Los resultados fueron expresados como copias de Rnr2 y Nd4 por copia de Ang1.

Para la determinación de la actividad enzimática de la cadena respiratoria mitocondria, homogenados de cultivos neuronales (pWPI, PWPIAlex3 y pLVTHM-shRNAi control y Alex3) fueron obtenidos como describe (Medja et al., 2009) y mantenidos a -80°C hasta su análisis. La actividad para el complejo IV y la actividad de la citrato sintasa (CS) del ciclo de Krebs fueron determinadas siguiendo los métodos previamente descritos (Medja et al., 2009) y mostrados por mg de proteína. Las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial fueron también referidas respecto a la actividad de la CS para normalizarlas por contenido mitocondrial.

El consumo de oxígeno fue medido usando un electrodo tipo Clark (Hansatech, Norfolk, Inglaterra) a 37°C, con continua agitación. Las células fueron recogidas por tripsinización, precipitadas por centrifugación, contadas y resuspendidas en DMEM que contenía 1 mM piruvato. Los ratios de respiración fueron monitorizados antes y después de la adición de 3 μ M carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), un desacoplante mitocondrial, o de 1,5 mM KCN, este último para sustraer el oxígeno.

El potencial de membrana mitocondria fue analizado usando JC-1 Assay kit (M341512, Invitrogen) (Salvioli et al., 1997). Brevemente, 5×10^6 neuronas hipocampales cultivadas fueron resuspendidas en medio de cultivo (1ml) e incubadas con o sin 150 nM CCCP a 37°C 5% CO_2 por 5 minutos (usadas como control positivo) y luego con 4 μM JC1 por 30 minutos adicionales. Las células fueron posteriormente lavadas y resuspendidas en 500 μl PBS y las señales de fluorescencia roja y verde fueron analizadas con un citómetro de flujo.

Para los análisis de bioluminiscencia, células HEK293T fueron sembradas en placas de 4 pocillos (15 mm de diámetro) a $3-5 \times 10^4$ células/pocillo. La recaptación de Ca^{2+} mitocondrial fue medida usando una aequorina mitocondrial fusionada con GFP (mitGA) como la prueba de Ca^{2+} (Manjarres et al., 2008; Manjarres et al., 2011) Células HEK293T fueron sembradas en placas de 4 pocillos (15 mm de diámetro) a $3-5 \times 10^4$ células/pocillo, transfectadas con 0,1 μg de mitGA y 0,4 μg de Alex3 (o pcDNA3 en el control) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y cultivadas por 24 h. En experimentos en paralelo con Alex3-GFP encontramos expresión mitocondrial en $>70\%$ de las células. Aequorina fue reconstituida con 1 μM coelenterazine por 60 minutos en medio libre de Ca^{2+} antes de las mediciones de concentración de Ca^{2+} mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{M}}$) en solución estándar de la siguiente composición (en mM): NaCl, 145; KCl, 5; CaCl_2 , 1; MgCl_2 , 1; glucosa, 10; sodium-HEPES, 10, pH 7,4. Luego, las células fueron perfundidas con la solución estándar a 3-5 ml/minuto a 22°C y la luminiscencia fue medida con el luminómetro Cairn Research (Manjarres et al., 2008). Los experimentos fueron siempre terminados por perfusión con una solución que contenía 100 μM digitonin y 10 mM Ca^{2+} con el fin de liberar todos los residuos de luz. Las calibraciones en $[\text{Ca}^{2+}]$ fueron realizadas usando los valores publicados previamente en (Montero et al., 2000). En los experimentos con células permeabilizadas, las células fueron perfundidas con una solución similar a la intracelular que contenía (en mM): KCl, 140; KH_2PO_4 , 1; succinato de sodio, 2; piruvato de sodio, 1; MgCl_2 , 1; Mg-ATP, 1; sodium-HEPES, 20; pH 7,2. Las células fueron permeabilizadas por incubación con 60 μM digitonina en una solución libre de Ca^{2+} (2 mM EGTA) por 1 minuto. Luego, la perfusión fue cambiada por medio suplementado con buffers EGTA o EGTA- Ca^{2+} para lograr la $[\text{Ca}^{2+}]$ (Bers et al., 1994).

Análisis de fusión mitocondrial

Análisis de correlación de intensidad fueron realizados para las imágenes de fluorescencia del rojo (MitDsRed foto-bleached) y el verde (mito-PAGFP fotoactivado) usando software de imagenes. Las imágenes de PDM (Product of the Differences from the Mean) a partir de los productos (+,+) fueron obtenidas (Li et al., 2004a) y los niveles totales de intensidad de la célula fueron usados para calcular los ratios de fusión mitocondrial.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el Igor Pro (WaveMetrics) y Origin 5.0 (Microcal Software) usando el test de la t de Student o el test de Mann–Whitney–Wilcoxon (MWW) para los datos no paramétricos. La significación estadística fue fijada a $p < 0.05$; * indica $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Análisis de cuantificación

Para la cuantificación de los fenotipos mitocondriales, las células fueron divididas en “Normal” para representar las células con un fenotipo indistinguible de células control, “Aggregated” referidas al fenotipo mitocondrial con un cluster de mitocondrias al lado de la zona perinuclear, y “Altered” que representa un fenotipo intermedio. Entre 113 y 344 células fueron cuantificadas para cada condición a partir de 2 experimentos independientes. Para la cuantificación de WB, el software “Gel-Pro Analyzer” fue usado. El valor IOD fue normalizado con respecto al valor control “Alex 3” y los resultados fueron mostrados debajo de las imágenes. Los valores por debajo de “0,05” fueron considerados como 0.

RESULTADOS

Capítulo I: Las proteínas mitocondriales codificadas por el cluster de genes específico de euterios *Armcx* regulan el tráfico neuronal e interaccionan con el complejo KHC/Miro/Trak2

El cluster *Armcx* se originó durante la evolución temprana de los placentarios.

Para ganar una mayor profundidad en la función de los genes *Armcx* (Alex), nosotros exploramos los genomas de humano y ratón por secuencias similares. Interesantemente, encontramos un set de genes codificantes para el dominio no caracterizado DUF634 que incluía a la proteína *Armcx3* (www.ebi.ac.uk/interpro/DisplayIproEntry?ac=IPR006911) y que se encuentran localizados en la misma región de los cromosomas X de humano (Xq22.1) y de ratón (X56/57cM), con la única excepción del gen *Armc10/SVH*, que se localiza en el cromosoma 7° en humanos y en el 5° en ratones. Esta organización inusual dio lugar a que analizáramos la génesis evolutiva de esta familia de genes (Figura 1a). Seis homólogos, llamados *Armcx1-6* y un pseudogen (ver Figura. 1a), están dispuestos en un único cluster en una porción del cromosoma X, que fue propuesta de ser específica de los mamíferos placentarios (Winter and Ponting, 2005). Posteriormente revisamos todos los genomas de vertebrado y notamos la ausencia de los genes *Armcx* en los mamíferos no euterios, dícese monotremas y marsupiales, y en los vertebrados no mamíferos, y su consistente presencia en todos los mamíferos euterios, incluyendo la rama más temprana del armadillo (Figura 2, 3 y 4). Por lo tanto, el cluster *Armcx* se originó al principio o en una radiación temprana de los mamíferos euterios más avanzados (Figura 1a). Además, el pariente filogenético más cercano a los genes *Armcx*, el gen *Armc10*, esta presente en una copia única en todos los genomas de vertebrados analizados, incluyendo los descendientes de la rama más temprana de los mamíferos (monotremas y marsupiales) y euterios. También, los análisis filogenéticos posicionan al gen *Armc10* como un grupo hermano de todos los genes *Armcx* (Figura 2) y la predicción *in silico* enfatiza la presencia de seis dominios similares a armadillo en el extremo carboxy-terminal de todas las proteínas (Figura 1b). Todos los dominios armadillo predichos incluyen las 3 características hélices α ricas en aminoácidos hidrofóbicos (Figura 5). Además, la mayoría de las proteínas *Armcx* incluyen péptidos señal (tales como un señal N-terminal con un potencial dominio transmembrana), una señal de localización nuclear y secuencias putativas de diana mitocondrial (Figura 1b), de acuerdo con nuestra información que indica que los genes *Armcx* se encuentran en la mitocondria (ver más abajo). En conjunto, estas observaciones sugieren que estas proteínas tienen unas funciones fisiológicas o celulares similares. Asimismo, inusualmente, todas las secuencias codificantes de los genes *Armcx* están localizadas en un único exón, mientras que *Armc10* es un típico, gen multi-exónico, con la secuencia codificante dividida en por lo menos 8 exones.

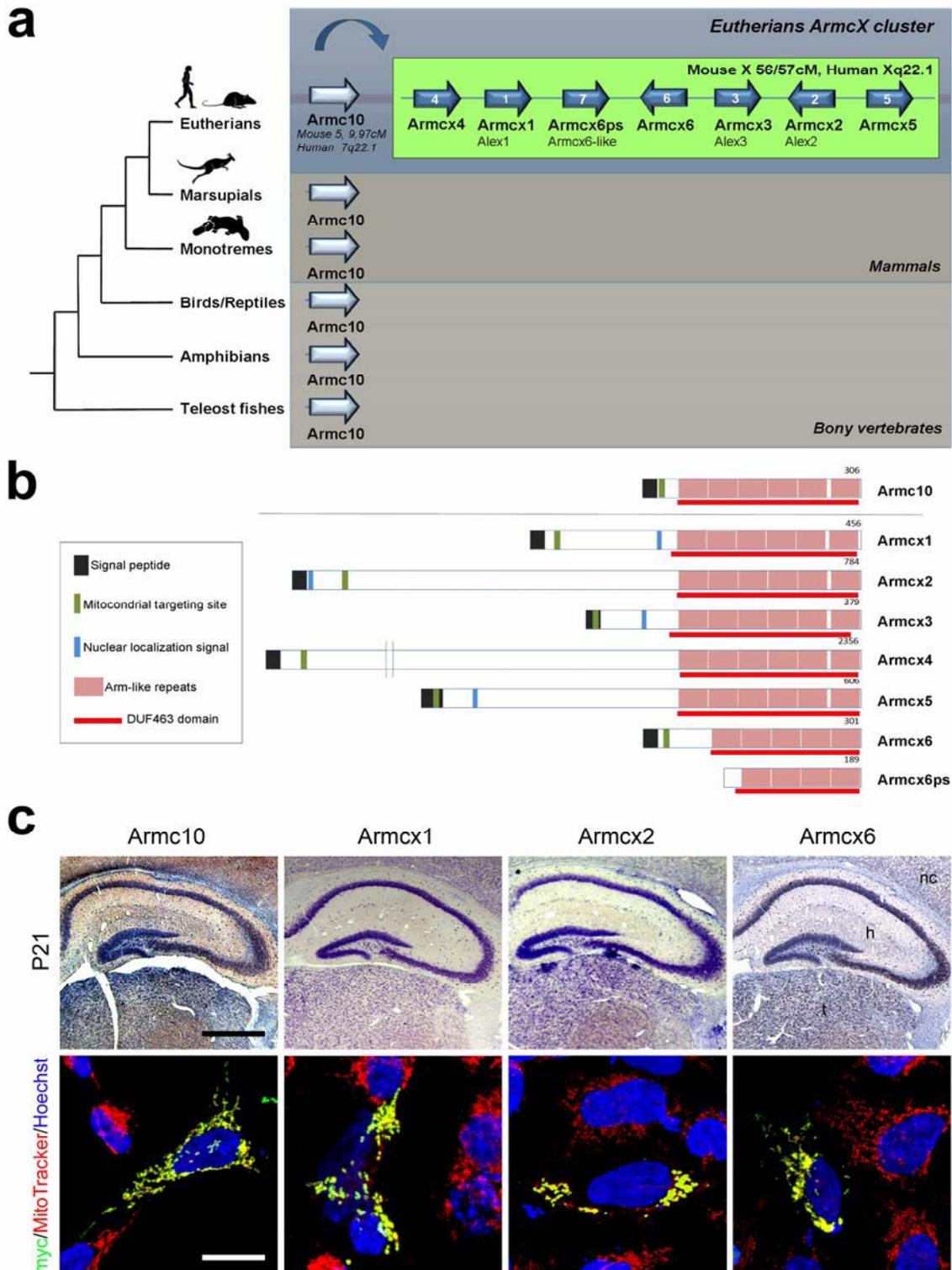


Figura 1: El cluster de genes *Armcx*, que codifica para las proteínas que contienen dominios armadillo y localizan en mitocondrias, aparecieron en el cromosoma X de los mamíferos euterios después de divergir de los *Methaterians* (marsupiales) y están predominantemente expresadas en cerebro. (a) El origen evolutivo del cluster *Armcx* en Eutherians, a través de la retrotransposición del gen autosómico *Armc10* (flecha curvada) y la duplicación en tándem en el cromosoma X ancestral de euterios. (b) Representación esquemática de la familia *Armc10/Armcx*. Están altamente conservados en el dominio C-terminal (DUF463) que consiste en hasta 6 repeticiones en tándem armadillo o similares a armadillo. En contraste la región N-terminal no está relacionada entre los miembros y es altamente variable en longitud y secuencia, aunque varios miembros comparten diferentes trazos comunes, tales como un péptido señal N-terminal con un potencial dominio transmembrana, una secuencia de localización mitocondrial y una señal de localización nuclear. (c) La expresión

de los mRNAs *Armxc* en el cerebro de ratón y la localización subcelular de las proteínas *Armxc*. Los paneles superiores muestran una hibridación in situ demostrando la alta expresión de los genes *Armcl0*, *Armcl1*, *Armcl2* y *Armcl6* en el hipocampo, neocórtex y tálamo. Los paneles inferiores muestran la localización mitocondrial de las proteínas *Armcl0*, *Armcl1*, *Armcl2* y *Armcl6* después de la transfección de los cDNAs con el epítipo myc en células HEK293AD. Las mitocondrias fueron marcadas con el marcador mitocondrial MitoTracker (rojo) y el núcleo fue marcado con Hoechst (azul). Barra de escala: paneles superiores 1mm; paneles inferiores 10 μ m.

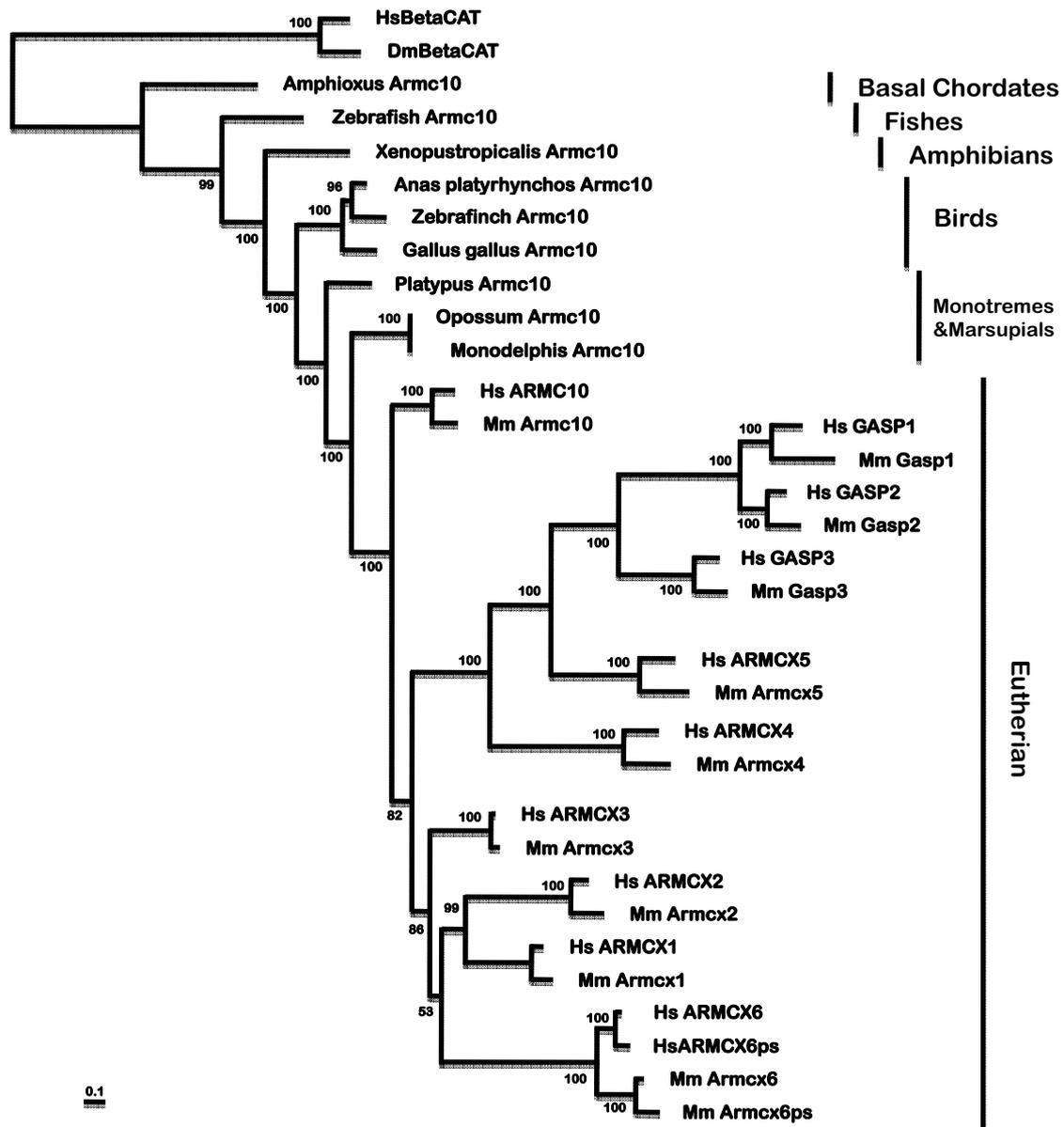


Figura 2: **Relaciones filogenéticas del clúster de genes *Armxc*.** Las secuencias del clúster de genes de euterios *Armxc* y el gen de vertebrados *Armcl0* fueron cogidas de las bases de datos de Ensembl (www.ensembl.org) y NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), y fueron corregidas manualmente cuando fue necesario. Los árboles de deducción bayesiana (BI) fueron deducidos usando MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Por consenso, la convergencia fue alcanzada cuando el valor de la desviación estándar de la separación de las frecuencias permanecía por debajo de 0,01. El “burn-in” fue determinado mediante colocación de parámetros a través de todos los tests para un análisis dado: todos los árboles previos al estacionamiento o convergencia fueron descartados y los árboles consenso fueron calculados para los árboles restantes. Dos MrBayes runs de 1.500.000 de generaciones cada uno fueron usados. Las proteínas β -Catenina que contienen dominios armadillo de humano y *Drosophila* fueron usadas como outgroups. Abreviaciones: Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Amphioxus, *Branchiostoma floridae*; Zebrafish, *Danio rerio*; Zebrafinch, *Taeniopygia guttata*; Platypus, *Ornithorhynchus anatinus*; Opossum, *Monodelphis domestica*.

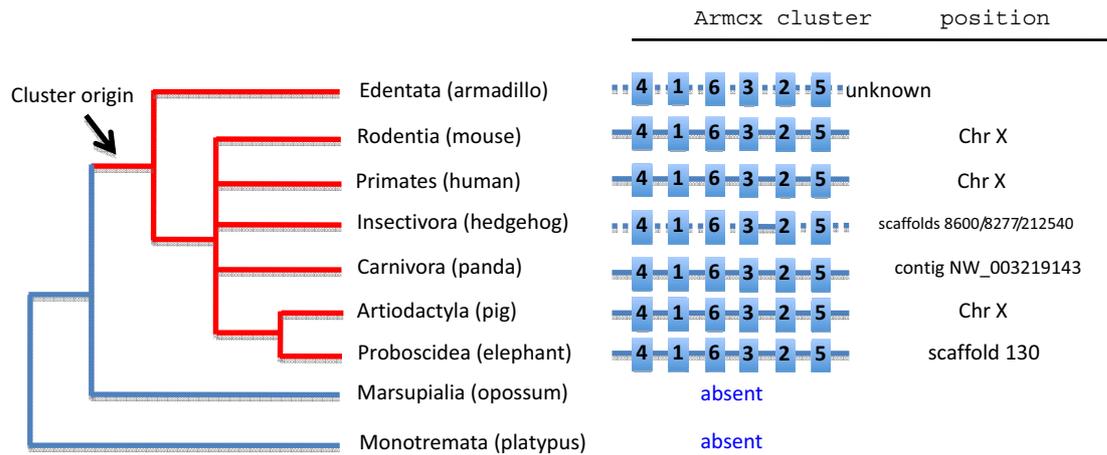


Figura 3: **El cluster Armcx en los genomas de mamíferos.** Los grupos principales entre los euterios (en rojo) fueron supervisados para verificar la presencia/ausencia del clúster de genes Armcx, y un animal representativo para cada clado fue supervisado en la base de la disponibilidad más apropiada del genoma. La presencia/ausencia de los genes individuales, el gen “linkage” y cromosoma (si estaba disponible, en otros casos los “scaffolds” y los datos “contig” fueron indicados) se muestran. Las búsquedas fueron realizadas por tBlastn con cada gen humano Armcx contra los genomas de ratón (*Mus musculus*), erizo (*Erinaceus europaeus*), panda (*Ailuropoda melanoleuca*), cerdo (*Sus scrofa*), elefante (*Loxodonta africana*), y el armadillo (*Dasyopus novemcinctus*). Las secuencias identificadas fueron comparadas recíprocamente contra las bases de datos de NCBI y en todos los casos el gen-class original Armcx fue recuperado, indicando una correcta identificación y ortología. Para el armadillo y el erizo, un MegaBlast contra los archivos disponibles de trazas de genoma de baja cobertura fue realizado, las trazas de los archivos montadas, el CDS reconstruido y comparado de nuevo con NCBI. Las líneas de puntos indican vínculos desconocidos en genomas no montados o baja cobertura genómica. Las relaciones filogenéticas entre los mamíferos fueron obtenidas del Tree of Life Web Project (<http://talweb.org/tree>). Los números de acceso y el porcentaje de identidad con respecto a los genes humanos están mostrados en la Figura 4.

De acuerdo con los datos indicados arriba, es probable que todo el cluster Armcx se originará en una evolución temprana de los mamíferos euterios por retrotransposición de un mRNA de Armc10, y luego por eventos consecutivos de duplicación en tándem en un región de evolución muy rápida en el cromosoma Xq (Winter and Ponting, 2005), que también incluiría a los genes relacionados con Armcx Gasp 1-3 (G-protein coupled receptor) (Simonin et al., 2004).

El preciso punto de inicio de la generación del cluster Armcx, cuando las innovaciones principales del grupo de los mamíferos tomaron lugar, como por ejemplo el origen de una bien desarrollada placenta, o el incremento en la complejidad del SNC y el aumento del neocórtex (Puelles, 2001), sugieren que este cluster tendría funciones relacionadas con los procesos arriba indicados. Por lo tanto, el origen del cluster Armcx puede haber estado ligado al aumento del neocórtex, ya que los marsupiales carecen del cluster Armcx pero tienen una placenta primitiva.

A continuación analizamos la expresión de los genes Armcx durante el desarrollo embrionario, y en el cerebro adulto. En los estadios embrionarios, Armc10 y los genes Armcx3-6 estaban altamente expresados en los tejidos neurales en desarrollo, en los derivados de la cresta neural y en las extremidades, así como en otros tejidos que eran específicos de cada gen (Figura 6). También encontramos que los genes Armc10 y Armcx 1-6 estaban

Mouse (*Mus musculus*) from NCBI.**Cluster on chromosome X.**

		Identity with human
Armxc1	NM_001166380.1	83 %
Armxc2	NM_001166398.1	78 %
Armxc3	NM_027870.3	97 %
Armxc4	XM_003085297.1	49 %
Armxc5	NM_001009575.4	57 %
Armxc6	BC027264.1	70 %

Panda (*Ailuropoda melanoleura*) from NCBI.**Cluster on “unknown” chromosome.**

		Identity with human
Armxc1	XM_002929434.1	87 %
Armxc2	XM_002929438.1	81 %
Armxc3	XM_002929437.1	96 %
Armxc4	XM_002929439.1	55 %
Armxc5	XM_002930095.1	79 %
Armxc6	XM_002929435.1	79 %

Pig (*Sus scrofa*) from NCBI.**Cluster on chromosome X.**

		Identity with human
Armxc1	XR_131289.1	85 %
Armxc2	XM_00313255.1	73 %
Armxc3	XM_003135254.1	97 %
Armxc4	FQ790386.1	49 %
Armxc5	XM_003135279.2	78 %
Armxc6	XM_003135250.1	73 %

Elephant (*Loxodonta africana*) from Ensembl.**Cluster on SuperContig Scaffold 130.**

		Identity with human
Armxc1	ENSLAFG00000022433	82 %
Armxc2	ENSLAFG00000018583	79 %
Armxc3	ENSLAFG00000010556	92 %
Armxc4	ENSLAFP00000018412	82 %
Armxc5	ENSLAFG00000000902	76 %
Armxc6	ENSLAFG00000004154	77 %

Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) from Ensembl.**Scaffolds 8600, 8277, 212540. Armxc5 on trace archives. Identity with human**

Armxc1	ENSEEUG00000000538	92 %
Armxc2	ENSEEUG00000013814	70 %
Armxc3	ENSEEUG00000013753	93 %
Armxc4	ENSEEUG00000013162	69 %
Armxc5*	gnl ti 909705256 gnl ti 957554472	73%
Armxc6	ENSEEUG00000013653	pseudogene

Armadillo (*Dasypus novemcinctus*) from NCBI.**No cluster information, data from trace archives.**

		Identity with human
Armxc1	gnl ti 1891262384 gnl ti 1735592015	89 %
Armxc2	gnl ti 1811035815 gnl ti 564577598	58 %
Armxc3	gnl ti 1903926904 gnl ti 1735565621 gnl ti 2010966194	95 %
Armxc4*	gnl ti 1902936902 gnl ti 1951032021 gnl ti 1889455894 gnl ti 596298443	87 %
Armxc5	gnl ti 564709143 gnl ti 1813998210	78 %
Armxc6	gnl ti 600334115 gnl ti 1891329374 gnl ti 1895135737	75 %

Figura 4: **Porcentajes de similaridad entre los genes Armcx.** Los números de acceso del clúster de genes Armcx de la Figura 3 fueron cogidos a partir de las bases de datos NCBI o Ensembl (actualizado en Julio de 2011), o a partir de la reconstrucción de las secuencias codificantes de los archivos de traza de genomas.

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?BLAST_SPEC=TraceArchive&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch). Los porcentajes de identidad entre cada proteína y su ortólogo humano están indicados en la derecha. * CDS parcial.

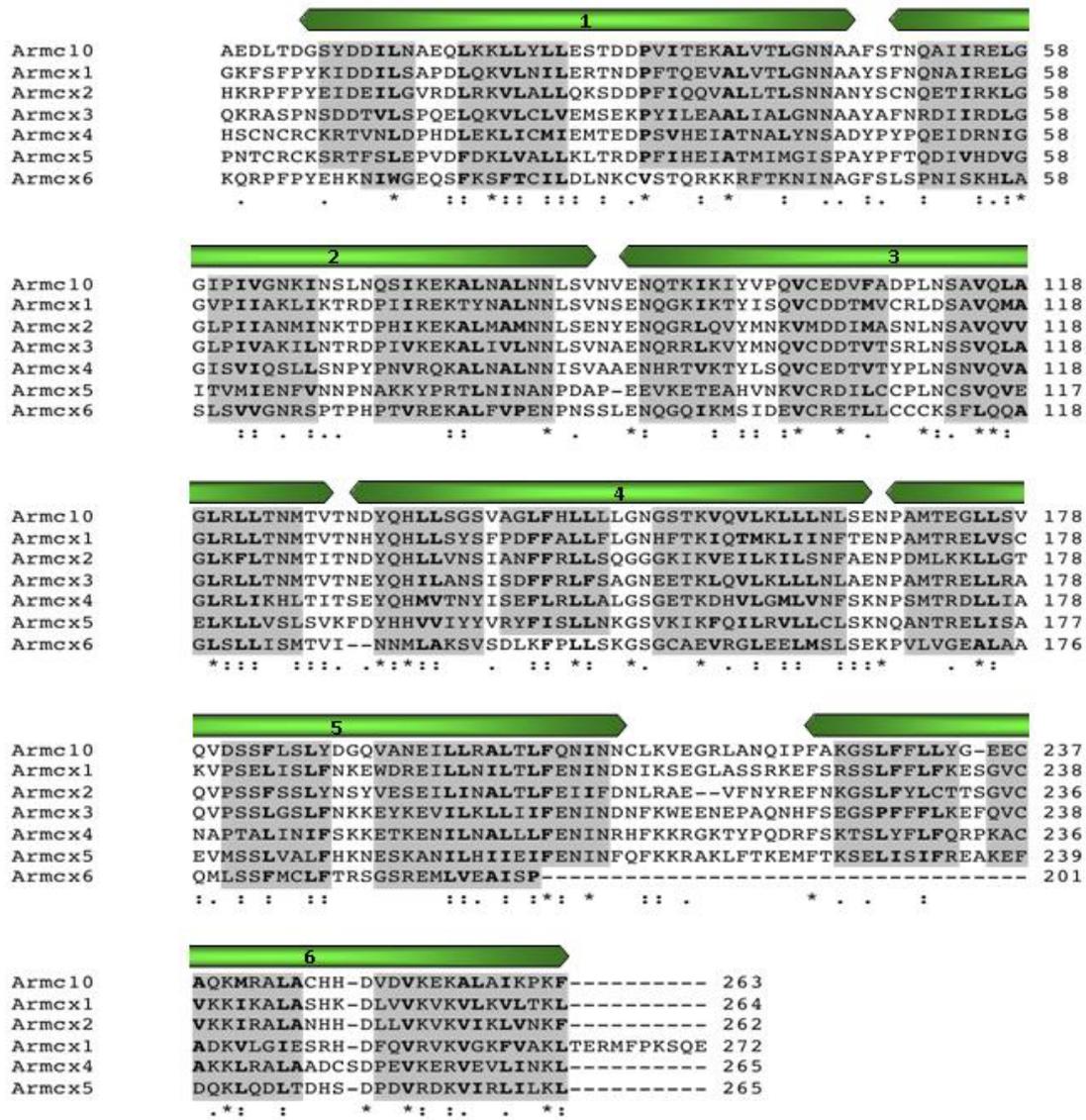


Figura 5: Alineamiento de la región carboxy Terminal (dominio DUF 634) de los Armc10 y Armcx1-6. Los dominios armadillo fueron identificados por una combinación de programas de predicción¹⁻⁴ y la similitud entre los genes Armcx (líneas de abajo) esta indicada por los rectángulos verdes numerados encima de la secuencia. Una caracterización más a fondo de las 3 hélices α características de los dominios armadillo individuales (Kippert and Gerloff, 2009) fue realizada por el Software HHPred, que identificó⁵, con la excepción de algunos dominios en la proteína divergente Armcx6, 3 hélices α con tamaños que concuerdan con los dominios armadillo (sombra gris). Los residuos hidrofóbicos en estas hélices que están consistentemente conservados en posición están remarcados en negrita.

1. Uniprot: www.uniprot.org
2. Prosite: prosite.expasy.org
3. Interproscan: www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/
4. Búsqueda de dominios conservados y CDArt: www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/toolkit.lmb.uni-muenchen.de/hhpred
5. www.hhpred.de

largamente expresados en el tejido nervioso adulto, especialmente en el cerebro anterior, incluyendo la corteza cerebral, el hipocampo y el tálamo (Figura 1c; Figura 7b). Así, concluimos que los genes Armcx codifican para un set de proteínas específica de euterios y que está altamente expresada en el tejido neuronal.

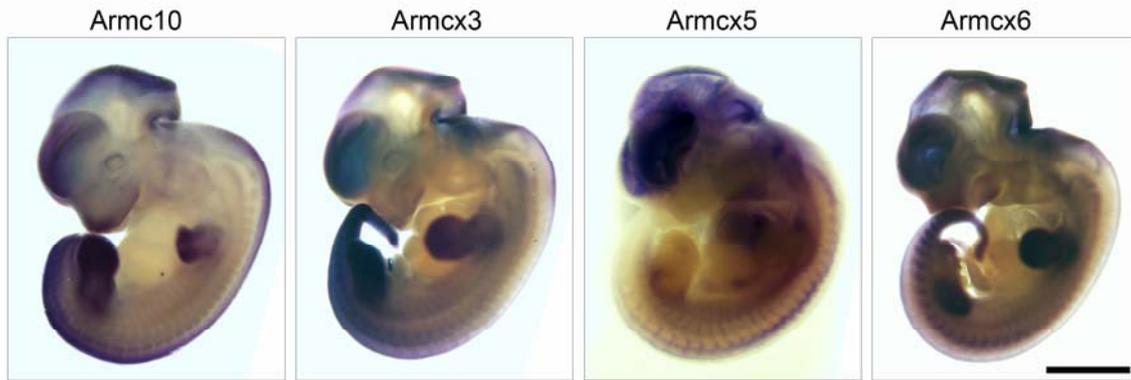


Figura 6: Patrón de expresión de los transcritos de *Armc10* y *Armcx3*, 5 y 6 en embriones murinos de edad E10. Hibridación in situ ‘in toto’. Destaca la marca de muchas estructuras neurales incluyendo el cerebro, también como otros tejidos, incluyendo las extremidades posteriores y los derivados de la cresta neural. Barra de escala: 2mm.

Los genes *Armcx* y *Armc10* codifican para proteínas que se localizan en la mitocondria

Para estudiar la localización subcelular de los productos de los genes *Armcx*, células HEK293AD fueron transfectadas con cDNAs codificantes para las proteínas “full-length” fusionadas a los epítomos EGFP o myc. De acuerdo con las predicciones de los dominios descritos arriba, todas las proteínas *Armcx* testadas (*Armcx1*, 2, 3, y 6) fueron localizadas principalmente en la mitocondria, lo que fue visualizado por el marcaje celular con MitoTracker (Figura 1c; Figura 8). Marcaje nuclear también fue visto ocasionalmente en algunas células (no mostrado). Interesantemente, la transfección con el cDNA codificante para *Armc10* (a partir del cual el resto de miembros ha evolucionado) dio lugar a un patrón idéntico de marcaje mitocondrial (Figura 1c). Muchas de las células transfectadas con los cDNAs *Armcx* 1, 2, 3, 6 y *Armc10* muestran una red mitocondrial alterada, en la cual las mitocondrias se encuentran agregadas en la región perinuclear (Figura 7a; Figura 8). Así, concluimos que el cluster *Armc10/Armcx* codifica para una nueva familia de proteínas mitocondriales que posiblemente regulan la distribución y dinámica mitocondrial.

Para ganar una mayor profundidad en el papel funcional de las proteínas Alex, nosotros nos enfocamos en Alex3 (Garcia-Frigola et al., 2004). Generamos anticuerpos contra un péptido sintético correspondiente a la secuencia de Alex3 (369-379aa). Después de la transfección de Alex3 en células HEK293AD, estos anticuerpos reconocían esta proteína en Western Blots (WBs) (en los tamaños predichos) y en las preparaciones para inmunofluorescencia (Figura 7a). Una banda similar fue detectada en WBs de lisados de cerebro (Figura 9). El patrón regional y celular del inmunomarcaje de Alex3 en secciones de cerebro fue idéntico al encontrado en los análisis de hibridación *in situ* (Figura 7b,c). Así, la proteína Alex3 se encuentra largamente expresada en la mayoría de las regiones cerebrales y neuronas; de acuerdo con un estudio previo (Garcia-Frigola et al., 2004), la expresión de Alex3 es elevada en los estadios postnatales (P0-P21) y disminuye ligeramente después. En

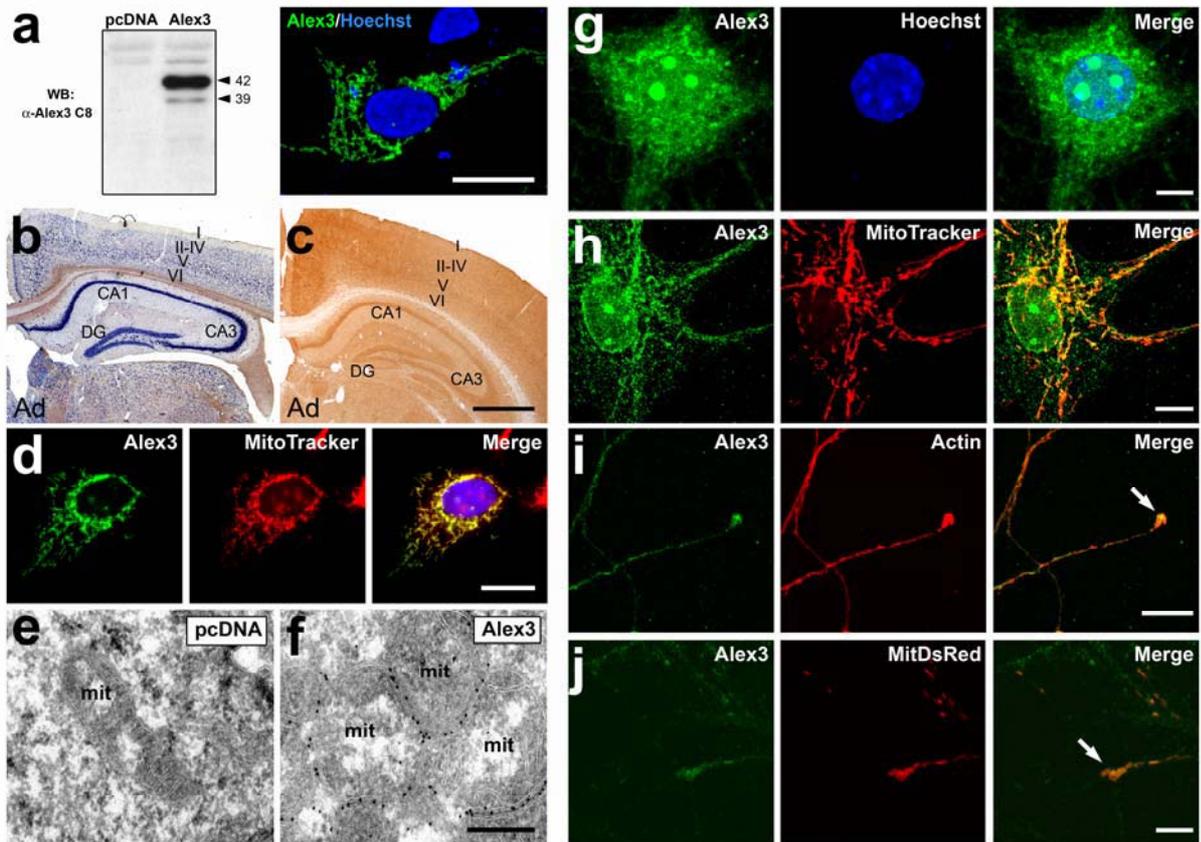


Figura 7: Expresión y localización de la proteína Alex3. (a) El anticuerpo anti-Alex3 específicamente reconoce la proteína Alex3. El anticuerpo reconoce dos específicas especies de alrededor de 42 y 39 KDa en células HEK293AD transfectadas con el cDNA *Armxc3*, como se muestra en el Western blot (panel de la izquierda). La detección inmunocitoquímica de la proteína Alex3 en células transfectadas (panel de la derecha). (b,c) Secciones coronales de corteza de ratón adulto muestran patrones similares de expresión de los transcritos de *Armxc3* (b) y la proteína Alex3 (c) en el neocórtex e hipocampo. (d) Imágenes confocales mostrando que Alex3 colocaliza con la mitocondria en células HEK293AD; las células fueron marcadas con MitoTracker. (e,f) Imágenes de microscopio electrónico de células HEK293AD transfectadas con un vector vacío (e) o con un vector de expresión de Alex3 (f), ilustrando la localización de Alex3 (partículas de oro) alrededor de la mitocondria (mit). (g-j) Inmunolocalización de la proteína Alex3 en neuronas hipocámpales en cultivo a 15 DIV. La proteína Alex3 endógena muestra una distribución heterogénea. Alex3 (verde) localiza en el núcleo, como muestra la colocalización con el marcador nuclear Hoechst (azul) (g); en el citoplasma la señal de Alex3 muestra un patrón punteado que corresponde con el compartimento mitocondrial marcado con MitoTracker (rojo) (h); en el citosol, Alex3 colocaliza con el marcaje de faloidina (rojo), particularmente en los conos de crecimiento (flecha) (i). (j) El marcaje de Alex3 marca también mitocondrias (marcadas con MitDsRed) en los conos de crecimiento. Abreviaciones: CA1-CA3: Cornu Ammonis1-3; DG: giro dentado; I-II-III-IV-V-VI: capas del neocórtex; mit: mitocondria. Barra de escala: 1 mm (b,c); 15 μ m (a,c,d); 5 μ m (g,h,i,j) y 0.02 μ m (e,f).

células HEK293AD transfectadas, el inmunomarcaje de Alex3 colocaliza, otra vez con mitocondrias, donde la señal de Alex3 parece envolver las mitocondrias individualmente (Figura 7d). Inmunomarcajes de oro en microscopía electrónica confirman que la proteína Alex3 rodea principalmente la membrana mitocondrial externa (Figura 7e,f). Los mismos hallazgos fueron encontrados en células HEK293AD transfectadas con Alex3 con los epítomos -myc y -EGFP (Figura 10a,d). Estas observaciones son consistentes con un estudio previo que describe la localización de la proteína Alex3 en las fracciones de la membrana mitocondrial externa (Mou et al., 2009).

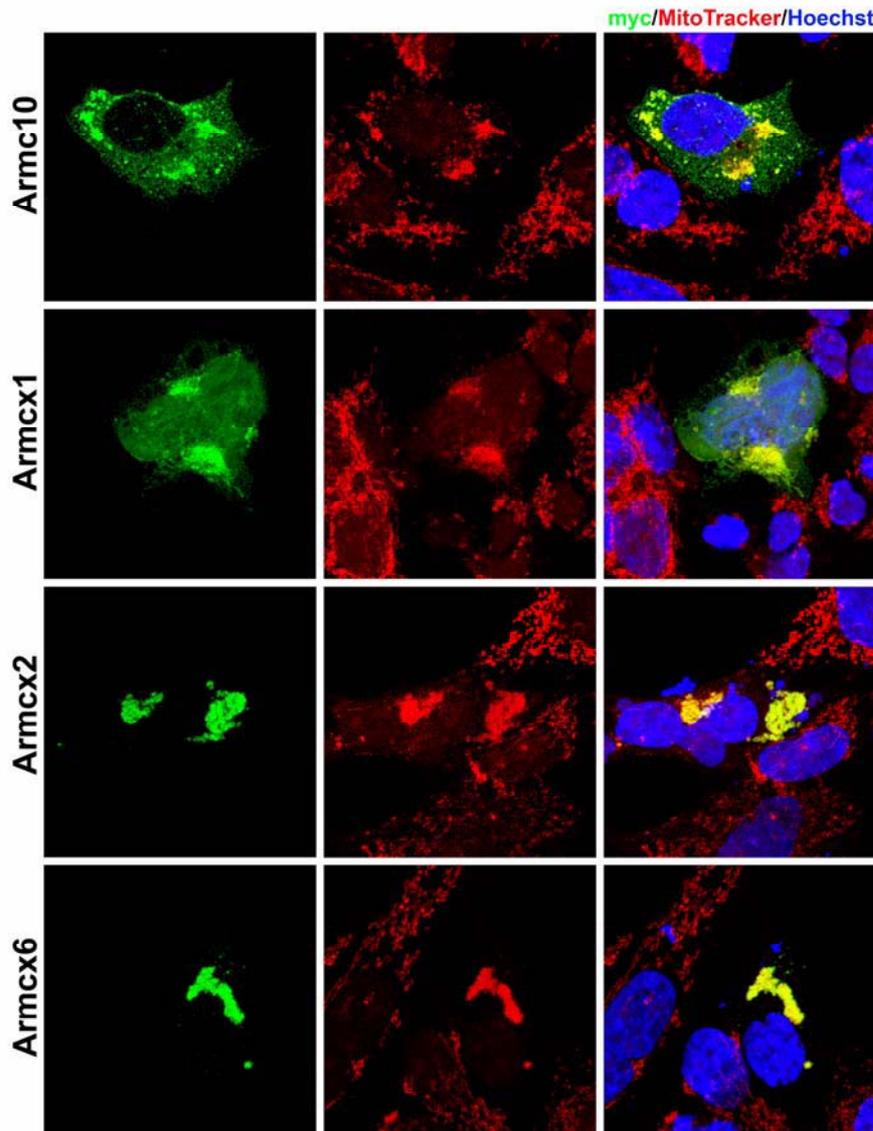


Figura 8: La sobreexpresión de las proteínas Armc10/Armcx induce la agregación mitocondrial en células HEK293AD transfectadas. Imágenes de fluorescencia de las versiones con el epítipo myc (verde) de Armc10, Armcx1, Armcx2 y Armcx6. La sobreexpresión de estas proteínas induce profundas alteraciones de la red mitocondrial (rojo), resultando en la formación de un cluster mitocondrial en la región perinuclear. Los núcleos fueron marcados con Hoechst (azul).

que la región que contiene los dominios armadillo no es requerida para el targeting mitocondrial (Figura 10c). Así, concluimos que la secuencia N-terminal de Alex3 es necesaria y suficiente para dirigir la proteína Alex3 a la red mitocondrial.

Para estudiar el papel de la proteína Alex3 endógena en neuronas, examinamos su distribución subcelular en cultivos de neuronas hipocámpales (Figura 7g-j). De nuevo, estas células exhiben una fuerte señal citosólica de Alex3, que colocaliza con la red mitocondrial en los cuerpos celulares, axones y dendritas (Figura 7h). Además, las señales de Alex3 fueron distribuidas a través del citosol. Estas señales muestran una fuerte colocalización con el

Para identificar las regiones de la proteína requeridas para esta localización, se generaron diferentes constructos truncados de Alex3-EGFP. La transfección con las deleciones en el extremo C-terminal produjeron un patrón de localización mitocondrial que fue indistinguible del observado con el cDNA Alex3-GFP “full-length” (Figura 10a,c). En contraste, una construcción deletada en el N-terminal (GFP-Alex3 Δ 1-12) evitó la localización mitocondrial e, interesantemente, dio lugar a una localización nuclear de la proteína de fusión GFP-Alex3 Δ 1-12 (Capítulo II, Figura 2d). Además, nosotros encontramos

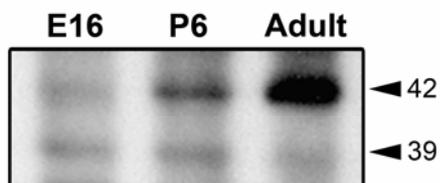


Figura 9: **Expresión de la proteína Alex3 en lisados de cerebro.** Análisis de Western Blot de lisados de corteza cerebral de ratones E16, P6 y adulto. 20 mg de proteína fueron cargadas para cada muestra. La incubación con el anticuerpo anti-Alex3 reconoce 2 bandas específicas de 42 y 39 KDa. La banda de 42 KDa incrementa su intensidad a lo largo del desarrollo.

citoesqueleto de actina, especialmente en neuritas y conos de crecimiento, donde Alex3 también colocaliza con mitocondrias (Figura 7i,j). Finalmente, muchas neuronas exhiben un inmunomarcaje de Alex3 en núcleo (Figura 7g). Así, nosotros concluimos que la proteína Alex3 endógena está localizada en por lo menos 3 pools y compartimentos neuronales: mitocondria, núcleo y citosol.

Alex3 regula la red mitocondrial y la agregación

Para estudiar si la proteína Alex3 regula el estado bioenergético mitocondrial o la recaptación de Ca^{2+} , realizamos diferentes experimentos. Primero, encontramos que la sobreexpresión de Alex3 en células HEK293T no altera el consumo de O_2 o el número de copias de mtDNA (Figura 11a,b). Estos datos, junto con los hallazgos en neuronas mostrando que los niveles de proteína de Alex3 no modifican los ratios COX/Citrato Sintasa, el número de copias de mtDNA o el potencial de membrana mitocondrial (Figura 11c-e) indican que esta proteína no está envuelta en la regulación de los parámetros mitocondriales bioenergéticos.

Para examinar si Alex3 controla la recaptación de Ca^{2+} , como es el caso de las mitofusinas (Singaravelu et al., 2011), transfectamos células HEK293T con una proteína aequorina mitocondrial fusionada a GFP (Manjarres et al., 2008), y medimos la recaptación de Ca^{2+} . Nuestros datos muestran que ni la recaptación de calcio liberado desde el retículo endoplasmático por estimulación con ATP+Carbachol (100 μM cada uno) ni la recaptación de Ca^{2+} mitocondrial en células cuya membrana plasmática ha sido permeabilizada por un tratamiento con digitonina fue alterada por la sobreexpresión de Alex3 (Figura 11f,g).

Durante los experimentos arriba descritos, observamos que las células transfectadas con Alex3 (así como con Alex1,2,6 y Armc10) exhibían redes mitocondrial alteradas (Figura 8; Figura 12a,b). Para profundizar en esta observación, células HEK293AD fueron transfectadas con Alex3 y la morfología mitocondrial de estas células fue monitorizada 2 días después (Figura 12a). Encontramos que el 88% de estas células presentaban unas redes mitocondriales anormales, similares a agregados. De estas células, el 33% mostraban fenotipos fuertemente agregados, en las que virtualmente todas las mitocondrias estaban concentradas en grandes y únicos agregados cerca del núcleo; el restante 55% mostraba grados variables e intermedios de mitocondrias agregadas y clusterizadas, en las que estos

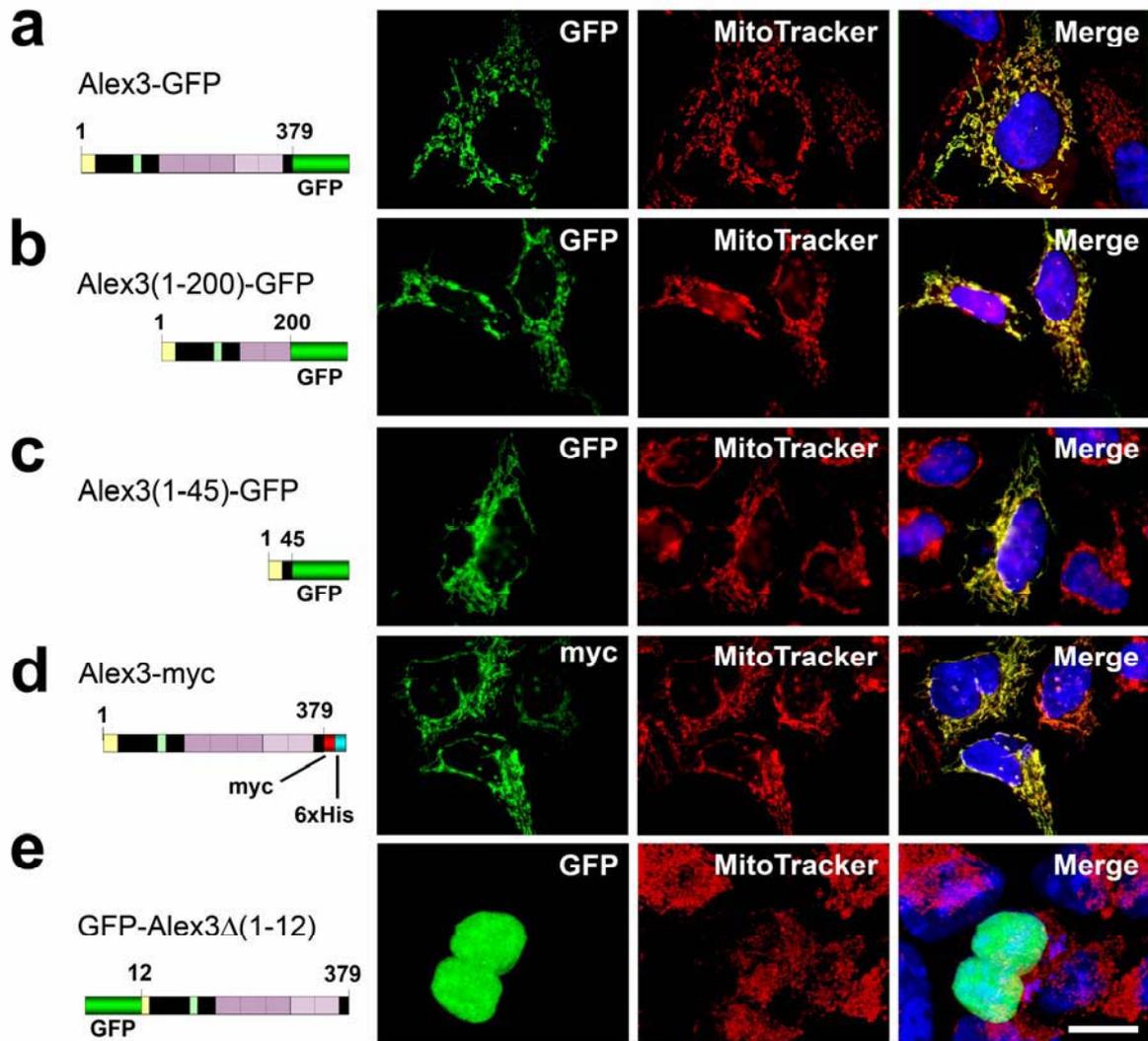


Figura 10: **El extremo N-terminal de Alex3 es necesario y suficiente para la localización de Alex3 en la mitocondria.** Células HEK293AD fueron transfectadas con diferentes construcciones deletadas de Alex3. Las proteínas truncadas en C-terminal: Alex3(1-200)-GFP (b) y Alex3(1-45)-GFP (c) localizaban en la red mitocondrial como lo hacen las proteínas full-length Alex3-GFP o Alex3-myc (a,d). La delección N-terminal (GFP-Alex3 Δ (1-12)) (e) impide la localización mitocondrial y conlleva a una localización nuclear (los núcleos fueron marcados con Hoechst). Barra de escala: 10 μ m.

orgánulos normalmente estaban agregados en varios clusters (Figura 12a,c). Resulto interesante que la severidad del fenotipo mitocondrial en células individuales correlacionara con los niveles de expresión de la proteína Alex3 (Figura 13), de una forma similar a lo que se encontró en células sobreexpresantes de mitofusina 1 (Santel et al., 2003).

Para confirmar estos hallazgos, fillmamos células HEK293AD transfectadas con Alex3-GFP a lo largo de 6 horas. Encontramos que, correspondiente a la expresión de Alex3-GFP, las mitocondrias individuales se agregaban hasta finalmente formar un o dos grandes clusters (Figura 12d). Además, análisis de microscopía electrónica de células HEK293AD transfectadas con Alex3-GFP confirmaron que Alex3 conlleva a una agregación de las mitocondrias (Figura 12e,f).

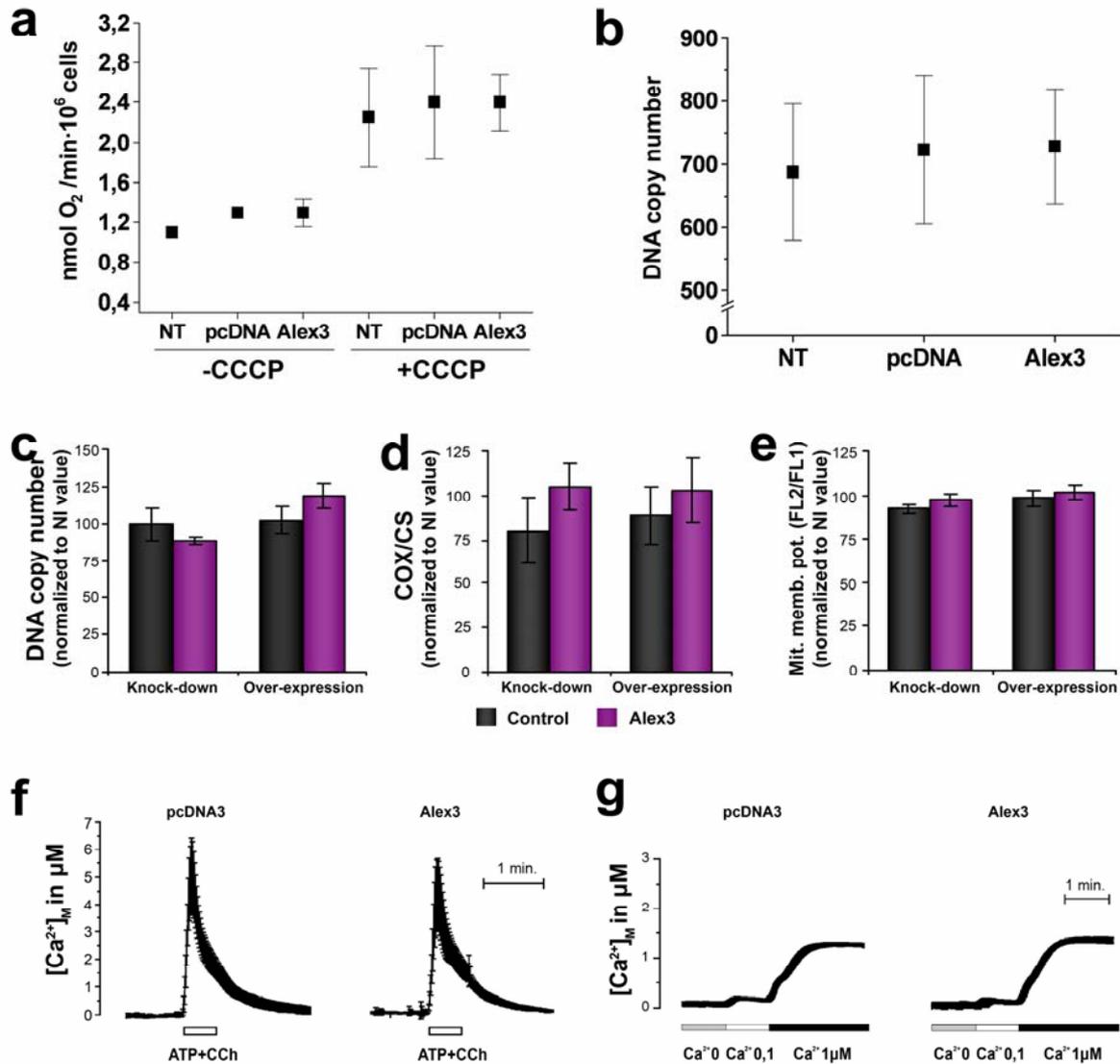


Figura 11: Ni la sobreexpresión ni el silenciamiento de Alex3 alteran los parámetros mitocondriales bioenergéticos ni la recaptación de Ca²⁺. Células HEK293T (a,b) fueron transfectadas con Alex3 o con pcDNA3-control, y el consumo de oxígeno (a) y el número de copias de DNA mitocondrial (b) fueron medidos. No hubo diferencias entre el control (pcDNA3 o células no-transfectadas NT) y las células sobreexpresantes de Alex3 (a,b). Cuando la proteína desacoplante CCCP fue añadida al medio, el consumo de oxígeno incremento pero nuevamente las diferencias no fueron estadísticamente significativas. (c,e) Neuronas hipocámpales fueron infectadas con pWPI (control), pWPI-Alex3, shRNAi-control o shRNAi-Alex3. Después de 7 días, el número de copias de DNA mitocondrial (c), la actividad de la COX y Citrato sintasa (d), y el potencial de membrana mitocondrial (e), (ensayo JC1, ratio entre la fluorescencia roja (FL2) y verde (FL1)). Los valores fueron normalizados contra los valores de las neuronas no infectadas (NI). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de arriba. Los valores muestran la media ± s.e.m. de 3 experimentos independientes. (f,g) La recaptación mitocondrial de Ca²⁺ en células HEK293T transfectadas con la aequorina localizada en mitocondrias (ver Métodos) junto con Alex3 (o pcDNA3 en el control). (f) Células intactas fueron estimuladas por ATP+CCh (100 μM cada uno) para elevar al máximo la liberación de Ca²⁺ inducida por IP₃ del ER. Debido a la elevada proximidad entre el ER y la mitocondria, mucho de este Ca²⁺ liberado es tomado por el transportador de Ca²⁺ mitocondrial. No hubo diferencias significativas entre las condiciones control (pcDNA3) y Alex3. (g) La recaptación desde el medio, similar a intracelular, fue directamente medida en células permeabilizadas con 60 μM digitonina por 1 minuto en una solución libre de Ca²⁺ (ver Métodos). Posteriormente la perfusión fue incrementando primero a 0,1 μM Ca²⁺, que es insuficiente para activar el transportador mitocondrial, y luego a 1 μM Ca²⁺, que promueve la recaptación mitocondrial de Ca²⁺. La recaptación fue similar en el control y en las células transfectadas con Alex3 en todas las condiciones experimentales. Los máximos ratios de recaptación de Ca²⁺ (medidos a 100 μM Ca²⁺, no mostrados) fueron también similares. Los datos representan la media ± s.e.m. de 4-5 experimentos independientes.

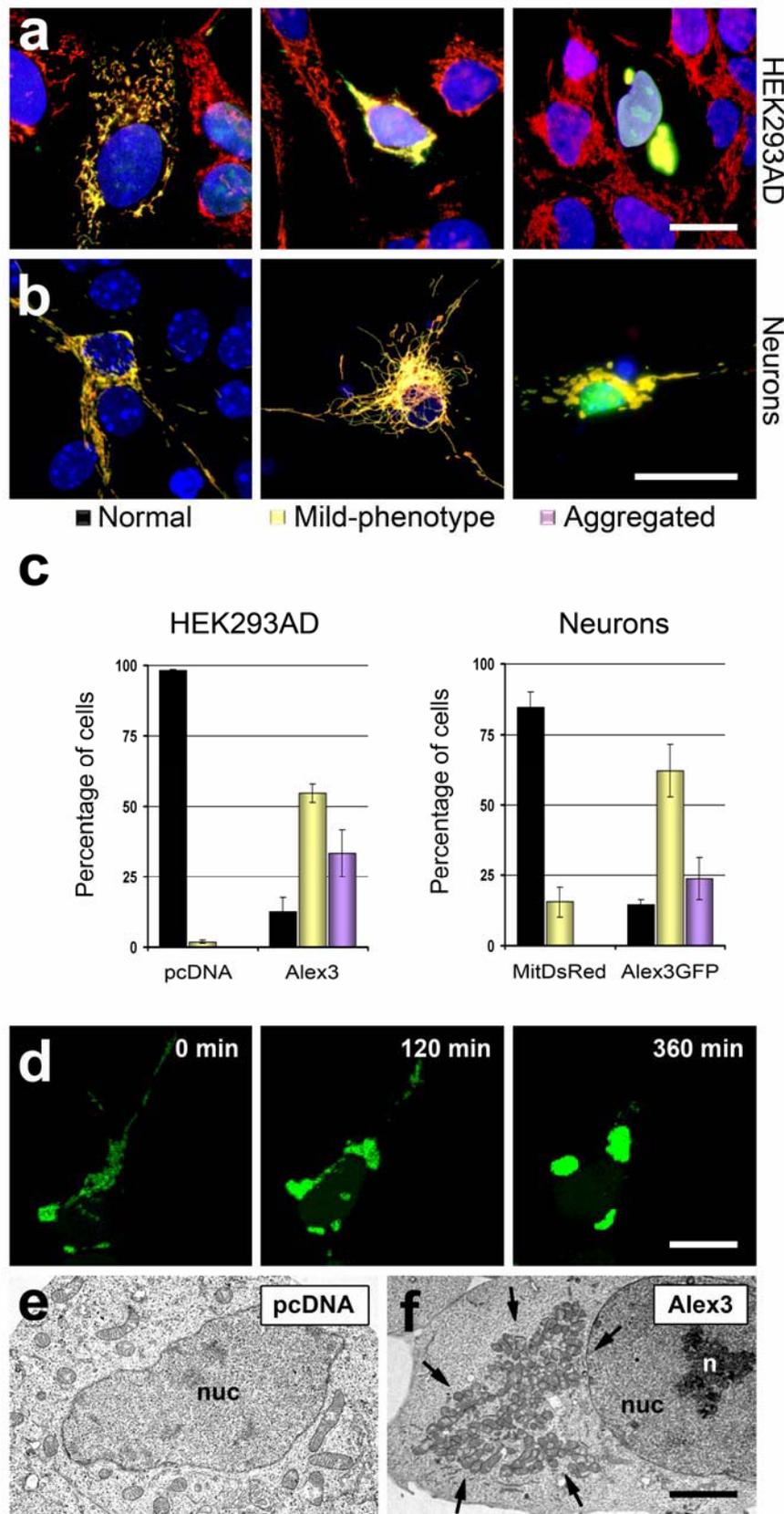


Figura 12: La sobreexpresión de Alex3 altera severamente la morfología y distribución mitocondrial, resultando en un clustering perinuclear y agregación. (a,b) La sobreexpresión de Alex3 en HEK293AD (a) o Alex3-GFP en neuronas hipocámpicas de 12 DIV (b) inducen severas alteraciones en la morfología y distribución de la red mitocondrial cuando se comparan con la expresión de un vector control (pcDNA en HEK293AD o MitDsRed en neuronas). Nosotros clasificamos estos efectos en una escala de 3 puntos desde cambios no sustanciales como se muestra en la primera columna, a un amplio espectro de alteraciones severas ilustradas en la segunda columna, al fenotipo más severo que consiste en la completa agregación de la red mitocondrial en la región perinuclear, como se presenta en la tercera columna. (c) Cuantificación y representación gráfica (media \pm desviación estándar) de las subpoblaciones mencionadas arriba de células sobreexpresantes de Alex3 o Alex3-GFP. (d) Series de imágenes a lo largo del tiempo de una célula HEK293AD sobreexpresante de Alex3-GFP mostrando la agregación mitocondrial. Nosotros contamos entre 167-345 células HEK293 y 51-116 neuronas por cada experimento. Los datos representan 2 y 3 experimentos respectivamente. (e,f)

Micrografías de microscopio electrónico de células HEK293AD sobreexpresando un vector control (e) o la proteína Alex3 (f). Las imágenes muestran los agregados mitocondriales y su localización cerca del núcleo. (d). Abreviaciones: n: nucleolus; nuc: nucleus. Barra de escala: 15 μ m (a,b,d); 2 μ m (e,f).

Con el fin de estudiar si la sobreexpresión de esta proteína también implica una agregación mitocondrial en neuronas. Nosotros transfectamos cultivos hipocampales (Figura 12b,c). Más de un 85% de las neuronas transfectadas con Alex3-GFP exhiben un fenotipo mitocondrial anormal; nuevamente, el 23% de las neuronas muestran mitocondrias completamente agregadas en clusters perinucleares, mientras que el 62% de neuronas muestran fenotipos intermedios con mitocondrias ligeramente agregadas. Estos fenotipos no fueron encontrados en neuronas control o en neuronas transfectadas con un cDNA control MitDsRed, en el que mitocondrias individuales eran claramente identificables (Figura 12c).

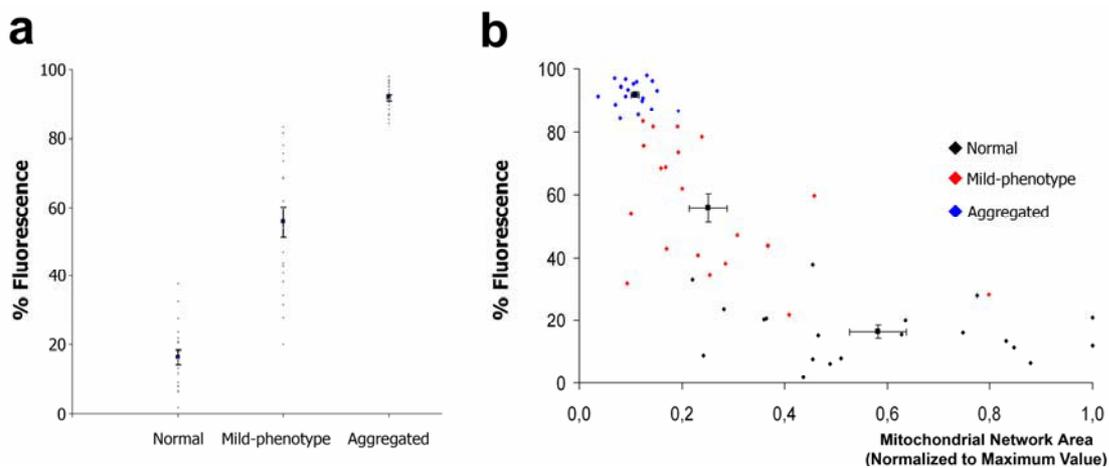


Figura 13: **Correlación de los fenotipos mitocondriales y los niveles de expresión de Alex3 en células aisladas.** La intensidad de fluorescencia de Alex3 (Image J) fue graficada (eje Y) frente a los fenotipos mitocondriales observados (a) y el área ocupada por la red mitocondrial (b). Destaca que los altos niveles de expresión de Alex3 correlacionan con fenotipos más fuertes (agregación mitocondrial). Los cuadrados negros representan la media \pm desviación estándar.

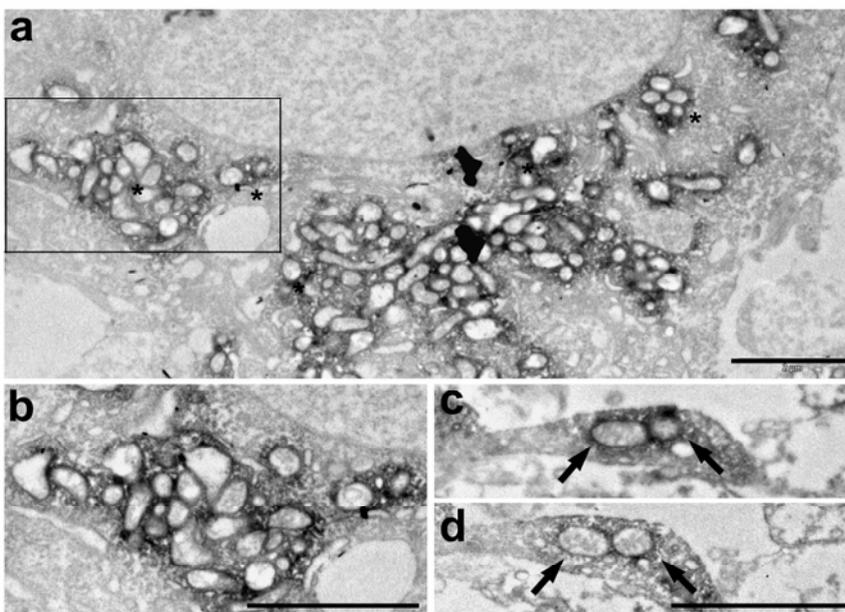


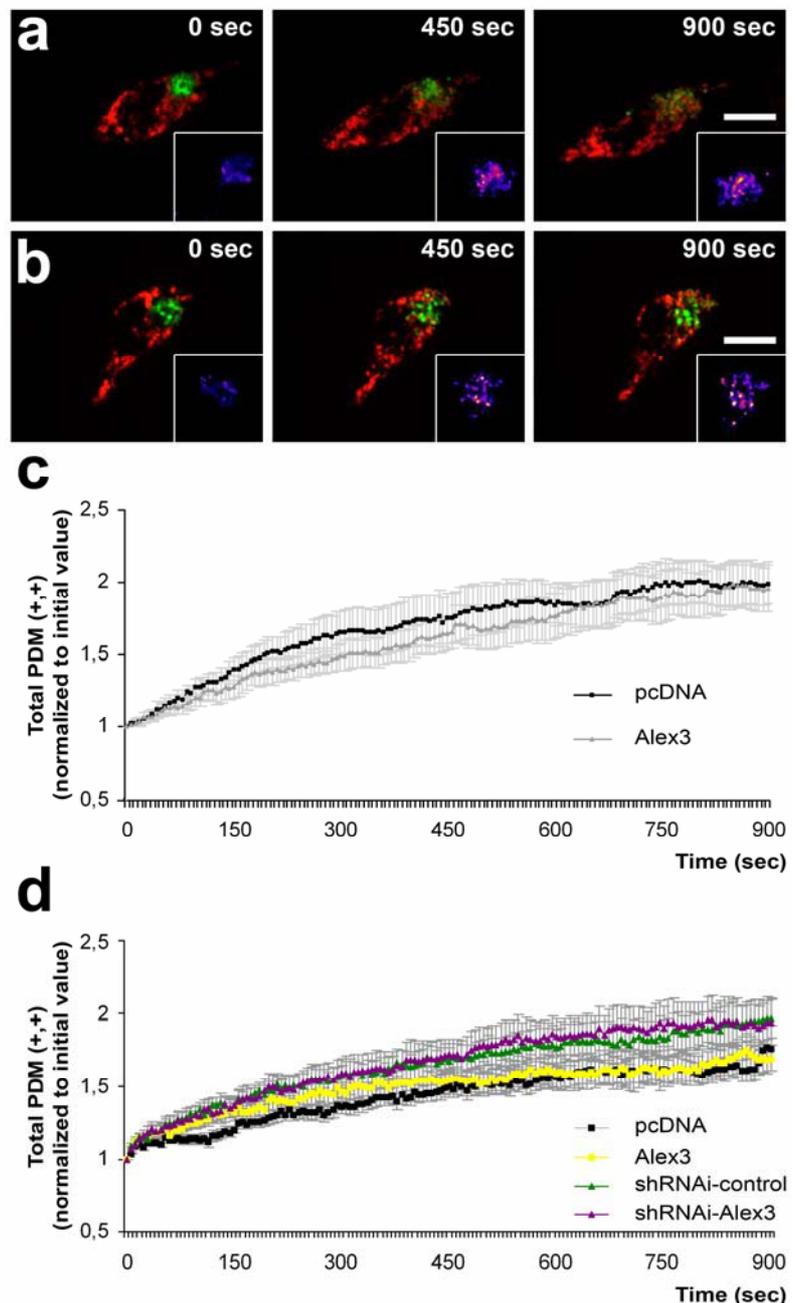
Figura 14: **Micrografías electrónicas de neuronas hipocampales en cultivo transfectadas con el vector Alex3-GFP e inmunomarcadas para la visualización de GFP usando una reacción HRP-DAB.** (a,b) Magnificaciones de bajo aumento de un cuerpo celular mostrando diferentes agregados de mitocondrias (asteriscos) rodeadas por el producto final de inmunomarcaje electro-denso. (b) Una magnificación mayor del área recuadrada en (a). (c,d) Micrografías de secciones seriadas ilustrando agregados de mitocondrias en neuritas

de neuronas transfectadas con Alex3-GFP. Destaca que las mitocondrias individuales (flechas), rodeadas por el producto final de la reacción de Alex3, parecen estar agregadas y clusterizadas en vez de fusionadas. Barra de escala: 2 μ m.

Para confirmar que Alex3 causa agregación, estudiamos finamente la estructura de las redes mitocondrial en neuronas hipocampales transfectadas con Alex3. Estas células muestran grandes agregados de mitocondrias en los cuerpos celulares, en los que mitocondrias individuales, rodeadas por el producto final inmunoreactivo a Alex3, eran claramente identificables (Figura 14). Un examen de las neuritas de estas neuronas transfectadas también mostraba la presencia de agregados alargados de mitocondrias (Figura 14). En conjunto, los datos arriba expuestos sugieren que el cluster de genes *Armc10/Armcx* (y particularmente *Armcx3*) codifican para proteínas envueltas en agregación y dinámica mitocondrial.

La dinámica mitocondrial es un complejo proceso que implica agregación, tráfico, y eventos de fusión y fisión. Para directamente probar si Alex3 regula la fusión mitocondrial, tomamos ventaja de la versión fotoactivable mito-PAGFP (Karbowski et al., 2004a). Células HEK293T transfectadas con mito-PAGFP fueron fotoactivadas y videos grabados a lo largo de 15 minutos, y los ratios de fusión

Figura 15: **La proteína Alex3 no altera la fusión mitocondrial.** (a,b) Células HEK293T fueron transfectadas con MitDsRed, mito-PAGFP y pcDNA (a), o Alex3 (b). Mito-PAGFP fue fotoactivado, MitDsRed fue fotobleachado a $t=0$ segundos, y las células fueron grabadas a lo largo de 15 min. Los paneles en (a,b) muestran la misma célula a diferentes tiempos; destacar el incremento de las señales amarillas que representa fusión mitocondrial. Los ratios de fusión fueron analizados (c) usando imágenes PDM (+,+) (mostradas en las áreas recuadradas en (a,b)). Once células, correspondiendo a 2 experimentos independientes, fueron cuantificadas para cada grupo (d) Los ratios de fusión mitocondrial a lo largo del tiempo en neuronas hipocampales sobreexpresantes de Alex3, o un shRNA, demostrando que los niveles de Alex3 no alteran la fusión mitocondrial en neuronas. Los niveles de expresión de la proteína Alex3 en las células sobreexpresantes de esta proteína fueron confirmados por inmunocitoquímica (no mostrado). Los valores muestran la media \pm s.e.m.. Barra de escala: 15 μ m.



mitocondrial a lo largo del tiempo fueron analizados (canal amarillo; Figura 15a,b). De acuerdo con estudios previos (Karbowski et al., 2004a; Saotome et al., 2008; Gomes et al., 2011), los resultados muestran un constante incremento en los eventos de fusión a lo largo del tiempo. Los ratios y dinámicas de estos eventos en células HEK293T co-transfectadas con mito-PAGFP y Alex3 fueron idénticas a las de células HEK293T control (Figura 15c; Figura 16). Experimentos similares en neuronas hipocampales, sobreexpresando Alex3 o una secuencia shRNA, dieron similares resultados (Figura 15d). En conjunto, estos experimentos sugieren que los niveles de proteína Alex3 no alteran la fusión mitocondrial ni en células HEK293T ni en neuronas.

Finalmente, realizamos experimentos para profundizar en el mecanismo molecular por el cual Alex3 puede regular agregación. Debido a que Miro1 interacciona con Alex3 (ver más abajo) y ha sido descrito que controla la agregación mitocondrial (Fransson et al., 2003; Fransson et al., 2006), testamos si esta proteína media los fenotipos de agregación mitocondrial inducidos por Alex3. Realizamos experimentos en células HEK293T co-transfectadas con shRNAs de Miro1 y con Alex3. El silenciamiento de la proteína Miro1 no altera los fenotipos de agregación causados por Alex3 (Figura 17). En conjunto, nuestros datos indican que la sobreexpresión de Alex3 conlleva a una agregación mitocondrial más que incrementar la fusión mitocondrial, por mecanismos independientes de Miro1.

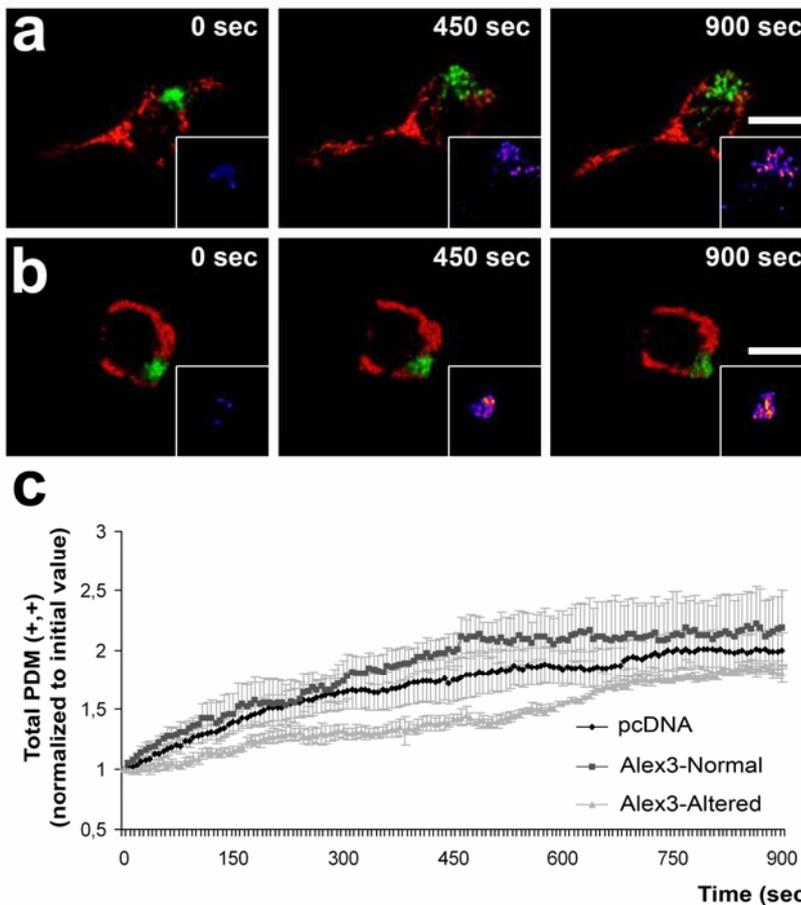


Figura 16: Los niveles de la proteína Alex3 no alteran la fusión mitocondrial. (a,b) Células HEK293T sobreexpresando MitDsRed, Mito-PAGFP y Alex3 con fenotipos mitocondriales normales (a) o agregados (b). Los ratios de fusión fueron analizados (c) usando imágenes PDM (+,+) (mostradas en las áreas (a,b)). pcDNA (n=11), Alex3 con fenotipos mitocondriales normales (n=4) o alterados (medio + agregados) (n=6) fueron cuantificados y un test de ANOVA fue aplicado. Los valores muestran la media \pm s.e.m.. Barra de escala: 15 μ m.

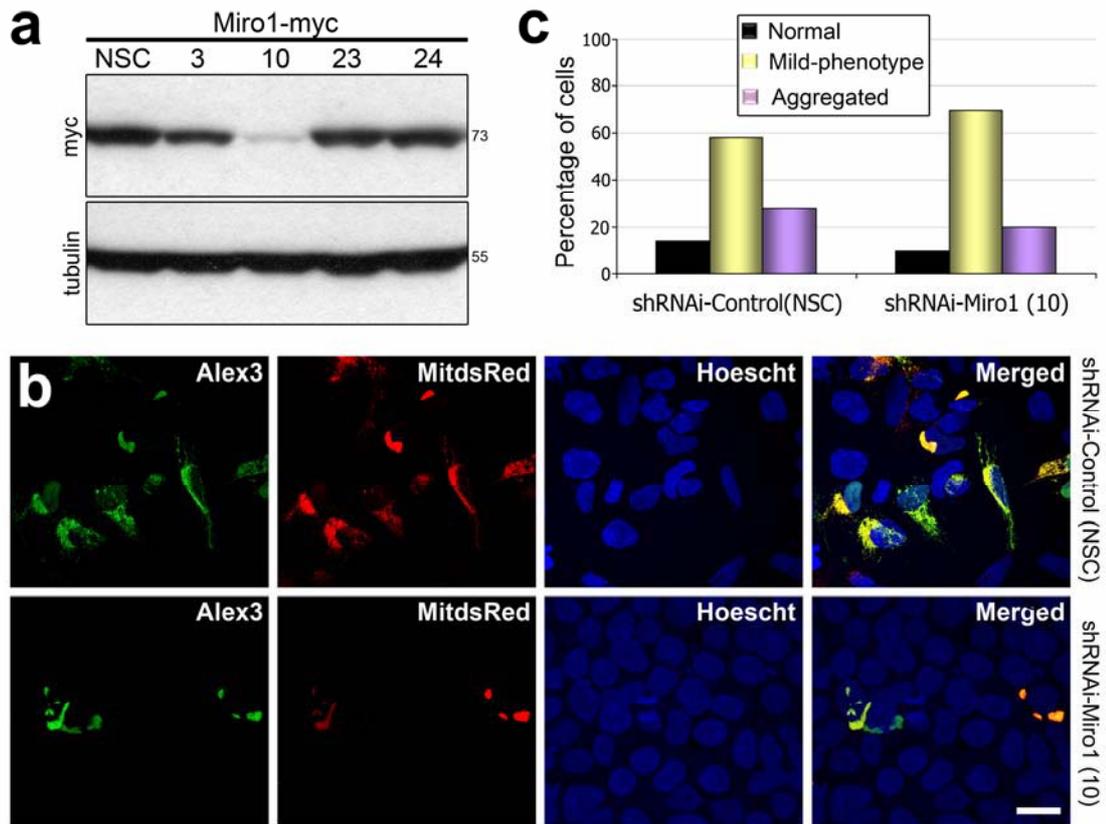


Figura 17: **El silenciamiento de Miro1 no reduce el clustering mitocondrial inducido por Alex3.** Células HEK293T fueron transfectadas con Alex3 y una secuencia shRNAi control o Miro1. **(a)** Western blot ilustrando el silenciamiento de la proteína Miro1 por la secuencia shRNAi Miro1 (#10). **(b,c)** Micrografías **(b)** e histograma **(c)** mostrando que las células co-transfectadas con la secuencia shRNAi control o con el plásmido shRNAi Miro1 muestran unos fenotipos de agregación mitocondrial similares. Barra de escala: 25µm.

Los niveles de proteína de Alex3 regulan el tráfico mitocondrial en neuronas

La regulación del tráfico y dinámica mitocondrial se piensa es esencial para suplir apropiadamente de energía a las ramas neuronales más distales, y consecuentemente para la correcta neurotransmisión y viabilidad neuronal. Además, mutaciones en los genes que codifican para las proteínas ligadas al transporte y dinámica mitocondrial normalmente conllevan a enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000; Zhao et al., 2001; Zuchner et al., 2004). Para averiguar si Alex3 está implicado en el transporte mitocondrial en axones, usamos técnicas de live-imaging. Cultivos de neuronas hipocámpales fueron transfectados a 4DIV con MitDsRed o Alex3-GFP. Después de 2 días, los axones de neuronas vivas fueron identificados y grabados a lo largo de 15 minutos (Figura 18). De acuerdo con estudios previos, las neuronas control exhiben ratios de motilidad alta, que eran transportadas en ambas direcciones, retrógrada y anterógrada (Figura 18a,b) Como describió (Hollenbeck and Saxton, 2005), solamente una fracción de las mitocondrias individuales (sobre un 30%, Figura 18e) se movían a lo largo de los 15 minutos de los

(Página anterior) Figura 18: **Los niveles de la proteína Alex3 regulan el transporte axonal de las mitocondrias en neuronas hipocampales.** (a,c) Series de 4 imágenes confocales representativas, tomadas cada 30 segundos, de axones sobreexpresantes de la proteína mitocondrial MitDsRed o la proteína fusionada Alex3-GFP (a), o MitDsRed más un control shRNAi o un shRNAi específico de Alex3(c). Las flechas coloreadas identifican la misma mitocondria a través de las diferentes adquisiciones. (c) Los paneles superiores identifican el axón representado expresando GFP tras la infección. (b,d) Quimografías representativas (dos por condición) del total del período de adquisición (i. e. 15 min. por película) en los experimentos de sobreexpresión (c) y en los de silenciamiento (d). Todas las quimografías están formadas con el extremo axonal distal a la derecha. (e,f) Representación gráfica del % de mitocondrias móviles, velocidad y distancia cubierta por mitocondrias individuales medidas en las quimografías para los experimentos de sobreexpresión (e) o silenciamiento (f). Los datos representan la media \pm s.e.m de 22-42 axones (neuronas) por grupo experimental, de por lo menos 8 experimentos independientes. ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05 (Para los P individuales ver texto). Barra de escala: 10 μ m.

periodos de grabación, mientras que las restantes permanecían estacionarias. La distancia cubierta en un único evento de tráfico por mitocondria también fue heterogénea. Mientras que algunas organelas se movían sobre relativamente largas distancias (más que 100-150 μ m), otras se desplazaban sólo unos pocos μ m (10-20 μ m). La velocidad a la que una sola mitocondria fue transportada también era variable (anterógrado: media=0.21 \pm 0.14 μ m/seg; rango: 0.07/1.03 μ m/seg; retrógrado: media=0.29 \pm 0.15 μ m/seg; rango 0.07/0.83 μ m/seg). El tráfico mitocondrial tendía a ser más activo en el sentido retrógrado que en el anterógrado (como % de mitocondrias móviles y velocidad; Figura 18e).

Grabamos únicamente neuronas transfectadas con Alex3-GFP que mostraban aparentemente una distribución normal de las mitocondrias en los cuerpos celulares y en axones. En estos cultivos, la proteína Alex3-GFP fue localizada en las mitocondria y virtualmente todas la red mitocondrial mostraba señales de Alex3 (Figura 18a; Figura 19). Nosotros también observamos que las mitocondrias individualmente eran más largas en las neuronas transfectadas con Alex3-GFP que en las células control (Figura 18a; Figura 20). El examen de las grabaciones de video indicaban que el transporte mitocondrial estaba reducido en estas neuronas. Para confirmar esta observación, grabaciones de video se representaron como quimografías (Miller and Sheetz, 2004) y la motilidad mitocondrial fue analizada cuantitativamente (Figura 18b,e). La comparación de la motilidad mitocondrial en neuronas control y transfectadas con Alex3-GFP reveló que la sobreexpresión de esta proteína resultaba en una reducción dramática en el porcentaje de las mitocondrias móviles, en ambos sentidos,

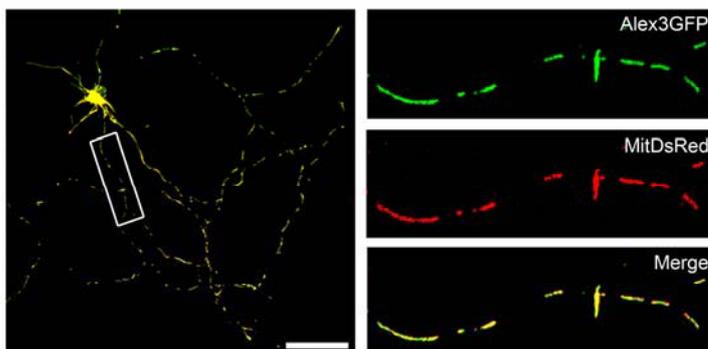


Figura 19: **Alex3-GFP expresado en neuronas hipocampales en cultivo localiza en la mitocondria.** Las neuronas hipocampales fueron cultivadas por 4 DIV y co-transfectadas con Alex3-GFP (verde) y con el marcador mitocondrial MitDsRed. Dos días después los cultivos fueron monitorizados. Ambas proteínas muestran una completa colocalización en el compartimento mitocondrial (amarillo en la imagen 'merge'). El área recuadrada es mostrada a la derecha.

anterógrado y retrógrado (Figura 18e). Este efecto fue independiente del tamaño mitocondrial (Figura 21). Además, la velocidad y la distancia media cubierta por cada mitocondria también se mostró alterada en las neuronas sobreexpresantes de Alex3-GFP (Figura 18e).

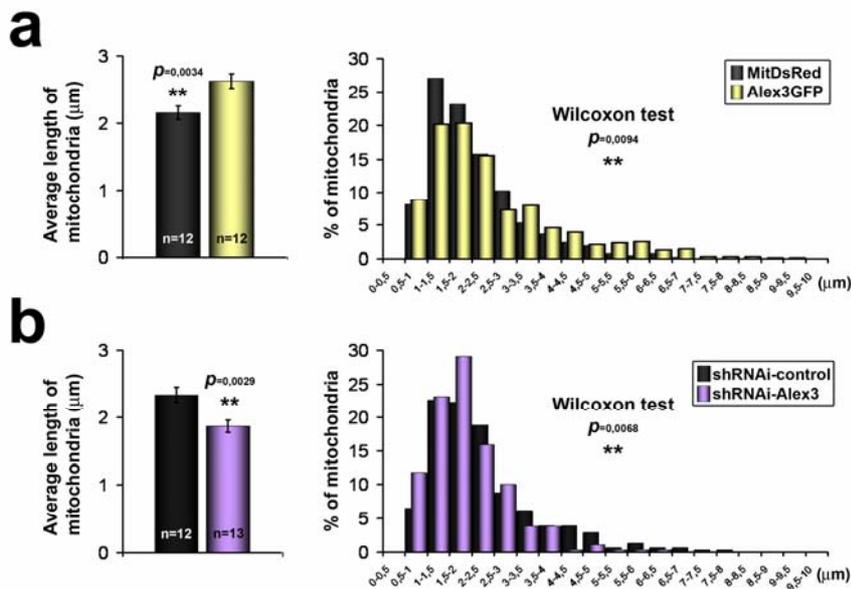


Figura 20: Los niveles de proteína Alex3 regulan el tamaño mitocondrial en neuronas.

Neuronas sobreexpresantes de Alex3-GFP tienen mitocondrias más grandes que las neuronas controles sobreexpresando MitDsRed (a), ambas cuando se compara la media de longitud por neurona y la distribución de longitudes de la población mitocondrial. El silenciamiento de la proteína endógena Alex3 con un shRNAi específico tiene el efecto opuesto en el tamaño mitocondrial, haciendo las mitocondrias más pequeñas que las neuronas controles (shRNAi-scrambled) (b).

Los experimentos arriba mencionados apuntan a una implicación de Alex3 en la dinámica y tráfico mitocondrial. Para confirmar esta noción, realizamos experimentos para silenciar la proteína endógena de Alex3. Neuronas hipocampales fueron transfectadas con vectores pLVTHM expresantes de la secuencia shRNAi-Alex3 (302) (Figura 22), o una secuencia scrambled control. Posteriormente la motilidad mitocondrial fue cuantitativamente evaluada como arriba (Figura 18c,d,f). Las neuronas que expresaban el shRNAi para los transcritos de Alex3 eran viables y morfológicamente normales, y ellas extendían dendritas y axones. Las neuronas expresantes de Alex3-shRNAi exhibían una motilidad mitocondrial reducida y mitocondrias más pequeñas que las neuronas control (Figura 18c,d; Figura 20b). Nuevamente, esta disminución era para el transporte anterógrado y retrógrado. Sin embargo,

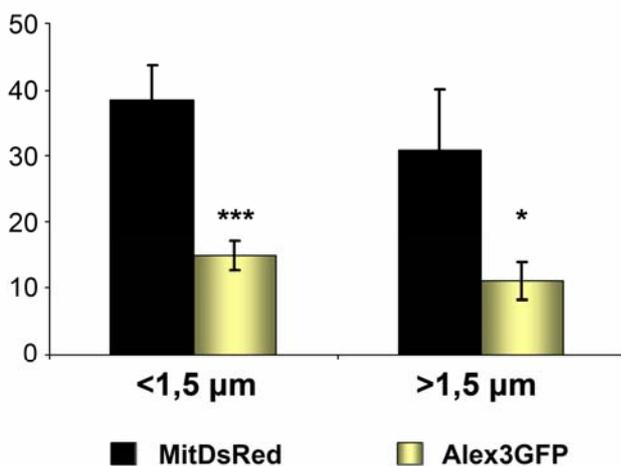


Figura 21: La sobreexpresión de Alex3 reduce la motilidad mitocondrial independientemente del tamaño mitocondrial. Mitocondrias de neuronas sobreexpresantes para MitDsRed o Alex3-GFP fueron agrupadas en dos categorías dependiendo de su tamaño (mayores de 1,5 μm y menores que 1,5 μm) y el % de mitocondrias móviles fue analizado para ambos casos. Los datos representan la media \pm s.e.m de 10 axones (neuronas) por grupo experimental. *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$.

ni la velocidad ni la distancia cubierta por los movimientos de mitocondrias individuales estaba alterada por el silenciamiento de Alex3 endógena (Figura 18f). Finalmente, comprobamos que los efectos de sobreexpresión y silenciamiento de Alex3 en el tráfico mitocondrial eran independientes de la formación o extensión de las neuritas (Figura 23).

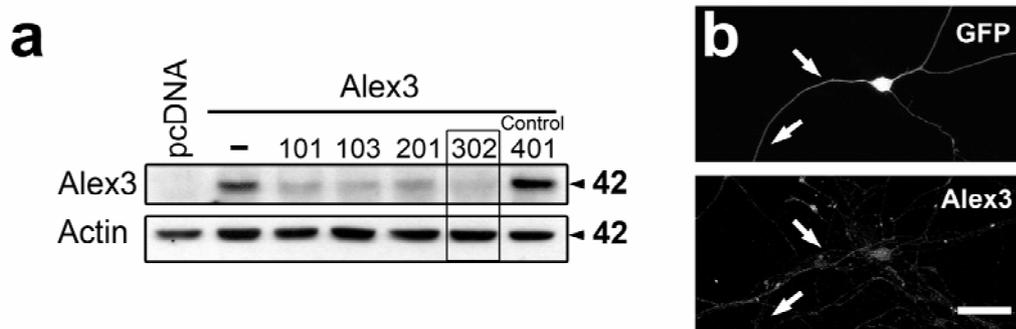


Figura 22: **El silenciamiento de Alex3 en células HEK293AD y en neuronas hipocampales.** (a) Células HEK293AD fueron transfectadas con un constructo de expresión de Alex3 y un vector pLVTHM que contenía diferentes secuencias shRNAi específicas para Alex3 (101, 103, 201, 302) y un control shRNAi scrambled (401). Todos los shRNAi testados silenciaron correctamente la expresión de Alex3 cuando son comparados con la secuencia scrambled. La secuencia shRNAi recuadrada, 302, fue seleccionada para realizar todos los experimentos de silenciamiento. (b) Neuronas hipocampales transfectadas con el shRNAi-Alex3 302 y GFP fueron marcadas contra Alex3 con el anticuerpo C8 para mostrar la especificidad del anticuerpo. Notar que las neuritas de las neuronas transfectadas (flechas) no muestran inmunomarcaje. Barra de escala: 30 μ m.

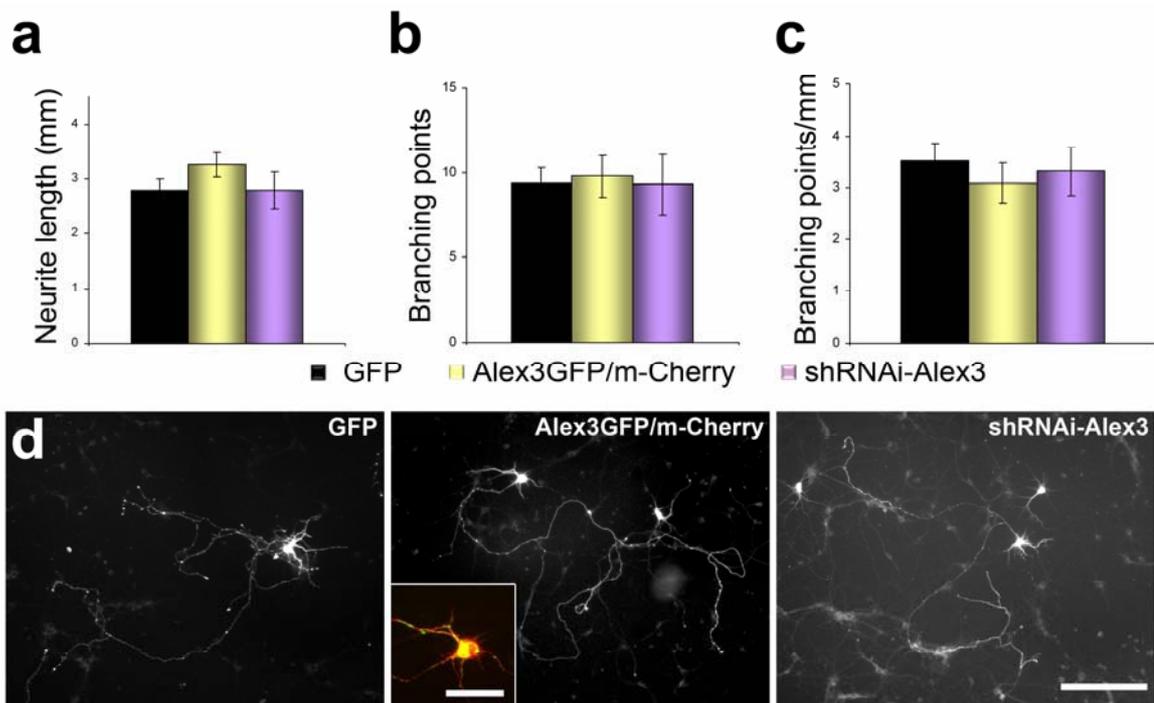
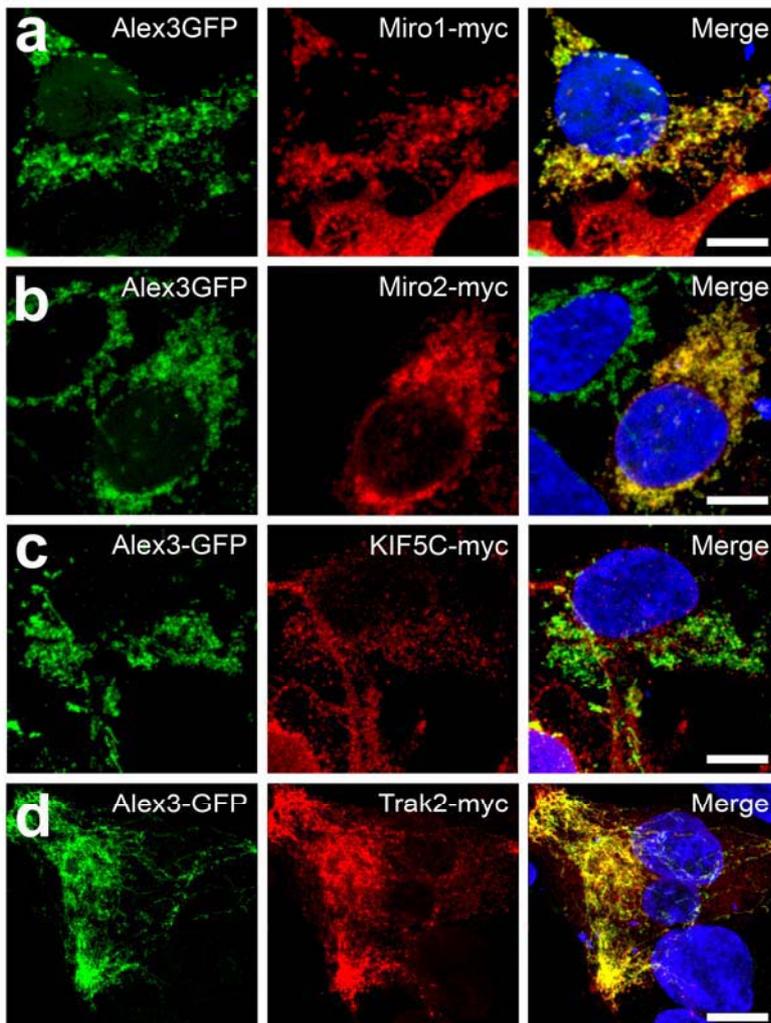


Figura 23: **Alex3 no afecta el crecimiento neurítico.** Neuronas hipocampales fueron transfectadas a 3DIV con GFP, con Alex3 y la proteína fluorescente m-Cherry o con el shRNAi específico de Alex3. El crecimiento neurítico fue analizado a 6DIV (a-c); la expresión de Alex3, Alex3 shRNAi y GFP fue comprobada por análisis de fluorescencia (d). En los paneles del medio el área recuadrada muestra una imagen ‘merged’ de Alex3GFP y m-Cherry, demostrando la sobreexpresión de Alex3. Entre 20-25 neuronas transfectadas fueron analizadas por condición (de 2 experimentos independientes). No se encontraron diferencias para la longitud total de la neurita (a), el número de puntos de ramificación por neurona (b) o el número de ramificaciones/mm (c) (media \pm s.e.m.). Barras de escala: 200 μ m; área recuadrada, 50 μ m.

En conjunto, estos experimentos muestran que los niveles de expresión de Alex3 regulan la motilidad media de las mitocondrias en los axones en neuronas vivas y modulan la velocidad y la distancia cubiertas por estas organelas.

Alex3 interacciona con el complejo KIF/Miro/Trak2

El tráfico mitocondrial en neuronas está mediado por los motores kinesina (KIF5) (Hirokawa and Takemura, 2004). Recientemente ha sido encontrado que las Rho GTPasas Miro1 y Miro2, así como el adaptador de kinesina Trak2, unen las mitocondrias a los motores KIF5, permitiendo el transporte mitocondrial en neuronas (Guo et al., 2005; MacAskill et al., 2009a). A continuación, estudiamos si Alex3 formaba parte del complejo de tráfico KIF5/Miro/Trak2. Primero, llevamos a cabo análisis de inmunofluorescencia en células HEK293AD transfectadas. Estas células mostraban una fuerte colocalización de Alex3 con Miro1, Miro2 y Trak2 mientras que aparentemente no se detectaba colocalización con KIF5C (Figura 24). A continuación, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en células HEK293AD transfectadas con los cDNAs de Alex3-GFP y o Miro1-myc o Miro2-myc. Miro1 y Miro2 con el epítipo myc fueron detectados por WB en lisados inmunoprecipitando con anticuerpos anti-GFP. A la



inversa, inmunoprecipitaciones con el anticuerpo anti-myc (Miro1-2) revelaron la presencia de la proteína Alex3-GFP. No hubo co-inmunoprecipitación cuando las células fueron transfectadas con el cDNA de Miro1/2-myc

Figura 24: Alex3-GFP transfectado colocaliza con los componentes de la maquinaria de transporte mitocondrial. Células HEK293AD fueron co-transfectadas con Alex3-GFP (verde) y con Miro1-myc (a), Miro2-myc (b), KIF5C-myc (c) o Trak2-myc (d) (rojo) y procesados para inmunocitoquímica. Los paneles de la derecha muestran una imagen 'merged' donde la colocalización (amarillo) de Alex3-GFP es aparente con Miro1-myc, Miro2-myc y Trak2-myc. Alex3-GFP y KIF5C-myc comparten bajos niveles de colocalización. Los núcleos fueron marcados con Hoechst (azul). Barra de escala: 10 μ m.

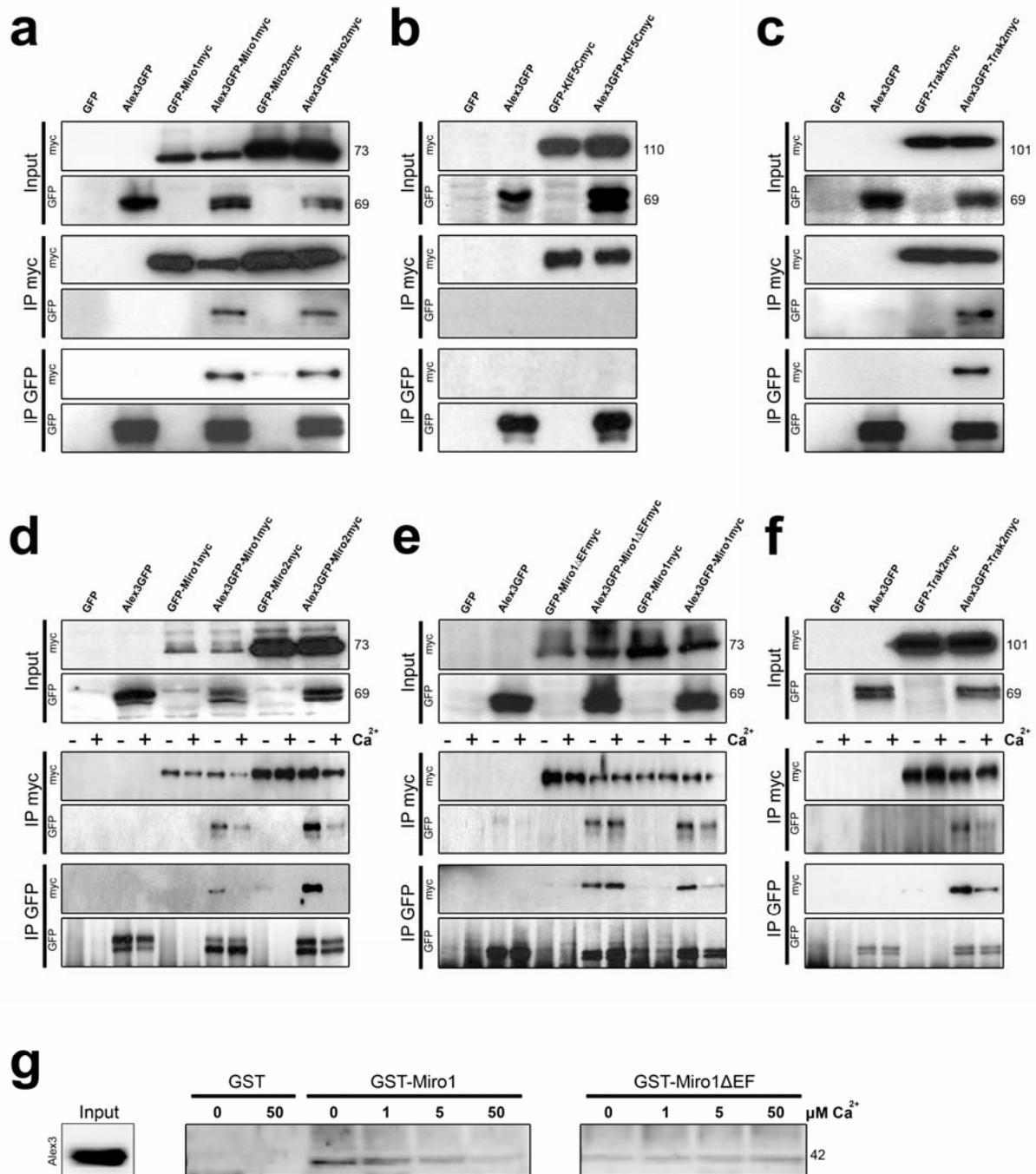


Figura 25: Alex3 es un componente del complejo kinesina/Miro/Trak2 responsable del transporte mitocondrial a través de microtúbulos, y esta asociación está regulada por los niveles de Ca^{2+} . (a-f) Un plásmido GFP fue usado como control. (a-c) Co-inmunoprecipitación de Alex3-GFP con Miro1myc, Miro2myc, KIF5Cmyc o Trak2myc resulta en la interacción específica de Alex3-GFP con Miro1myc, Miro2myc (a) y Trak2myc (c) pero no se detectó interacción entre Alex3-GFP y KIF5Cmyc (b). (d) La interacción entre Alex3-GFP y Miro1myc y Miro2myc está reducida en presencia de 2 mM de calcio. (e) Cuando el mutante EF-hand de Miro1myc es co-expresado con Alex3-GFP, la interacción entre los 2 componentes deja de ser sensible a los niveles Ca^{2+} . (f) La asociación entre Alex3-GFP y Trak2myc es también dependiente de la presencia de Ca^{2+} , indicando por lo tanto que el complejo al completo es desmantelado cuando Miro1/2 reconoce un incremento en los niveles de Ca^{2+} . (g) Ensayos de pull-down usando proteínas GST-Miro1 y GST-Miro1 ΔEF purificadas como cebo y mostrando la interacción con Alex3 (en lisados de cerebro) y su dependencia en la concentración de Ca^{2+} . La falta de los dominios EF-hand en la proteína Miro-1 impide la dependencia de Ca^{2+} (panel de la derecha).

o Alex3-GFP solos (Figura 25a). Experimentos similares mostraron que Alex3-GFP co-inmunoprecipitaba con la proteína Trak2-myc in células transfectadas (Figura 25c). En contraste, no detectamos co-inmunoprecipitación de Alex3-GFP con KIF5C-myc (Figura 25b) o con KIF5-A o KIF5-B (no mostrado). Estos datos indican que Alex3 interacciona directamente con las proteínas Miro1-2/Trak2, por lo tanto sugiriendo que esta proteína está implicada en el complejo de tráfico de KIF5/Miro/Trak2.

Para determinar si los seis dominios similares a armadillo eran requeridos para la interacción con estas proteínas, generamos un constructo N-terminal (1-106) sin estos 6 dominios armadillo. Experimentos de co-inmunoprecipitación en células HEK293T transfectadas mostraron que este mutante de la proteína Alex3 no co-inmunoprecipitaba con las proteínas Trak2 o Miro2 (Figura 26), por lo tanto indicando que la región C-terminal que contiene los dominios armadillo es requerida para esta interacción.

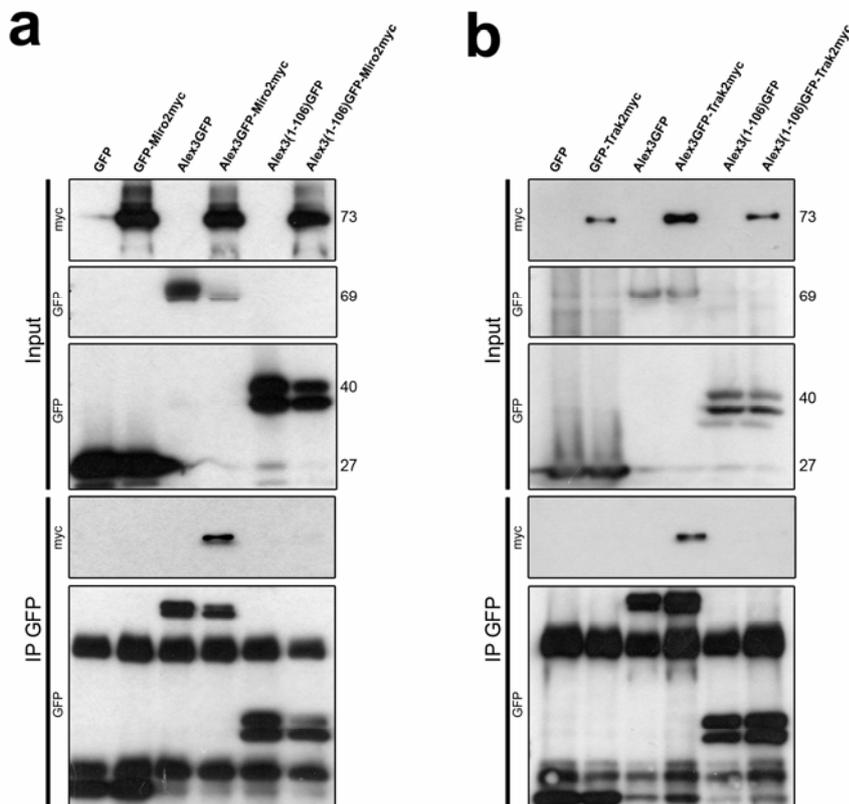


Figura 26: Los dominios armadillo de Alex3 son necesarios para la interacción de Alex3 con Miro2 y Trak2. Células HEK293T fueron co-transfectadas con Alex3-GFP full-length o una deleción mutante Alex3GFP(1-106) al que le faltan los seis dominios armadillo, y con Miro2-myc o Trak2-myc; los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-GFP. Mientras la proteína Alex3 full-length inmunoprecipita con las proteínas Miro2myc/Trak2myc, no se encontró inmunoprecipitación entre Alex3GFP(1-106) y Miro2myc o Trak2myc.

Estudios recientes han mostrado evidencias que el complejo Miro/Trak2 interacciona con los motores kinesinas de forma dependiente de Ca^{2+} , en el que el Ca^{2+} se une a las proteínas Miro y desencadena el desacoplamiento del complejo a los microtúbulos, permitiendo así el arresto mitocondrial (MacAskill et al., 2009b; Wang and Schwarz, 2009). Testamos así si la asociación de Alex3 con el complejo de tráfico era también dependiente de Ca^{2+} . La presencia de 2mM Ca^{2+} reduce de forma clara la interacción de Alex3 con Miro1,2 y Trak2 (Figura 25d,e). Resulta interesante que la co-transfección de Alex3-GFP con un cDNA

de un mutante de Miro1-myc al que le faltan los “EF hand”, dominios responsables para la unión de Ca^{2+} , bloquea la regulación de la interacción de Miro1/Alex3 por Ca^{2+} , reforzando así la idea que la interacción entre estas dos proteínas es regulada por los niveles de Ca^{2+} (Figura 25f). Para corroborar estos hallazgos, realizamos experimentos adicionales usando proteína purificada GST-Miro1 y realizamos pull-downs con extractos de lisados de cerebro (MacAskill et al., 2009b). Estos experimentos confirmaron la interacción de las proteínas Alex3/Miro1, así como la regulación de esta interacción por Ca^{2+} , y la dependencia de los dominios “EF hand” en la proteína Miro1 para la regulación del complejo por Ca^{2+} (Figura 25g). En conjunto, los datos mostrados arriba demuestran que Alex3 pertenece al complejo de tráfico mitocondrial KIF5/Miro1-2/Trak2 y que la interacción de Alex3/Miro1 requiere bajas concentraciones de Ca^{2+} .

Capítulo II: La vía no canónica Wnt/PKC regula la dinámica mitocondrial a través de la degradación de Armcx3 en células HEK293.

La región N-terminal de Alex3 es necesaria y suficiente para la localización y agregación mitocondrial

Alex3 es una proteína de 379aa que contiene diversas regiones y motivos, incluyendo 6 dominios similares a armadillo formando un dominio DUF463 (aa110-363), una señal de localización nuclear (aa 89-98) y una región N-terminal con un potencial dominio transmembrana (aa 7-29). Flanqueando esta región transmembrana se encuentra una putativa señal de localización en la membrana mitocondrial externa caracterizada por la posesión de aminoácidos básicos en ambos lados de la región trasmembrana (Rapaport, 2003) (Figura 1). Estas predicciones de secuencias proteicas relacionadas con la mitocondria están de acuerdo con la localización preferente de la proteína Alex3 en la mitocondria (Mou et al., 2009). Para caracterizar las regiones de la proteína Alex3 necesarias para la localización mitocondrial, generamos diferentes constructos de Alex3 con deleciones en la región C-terminal, que se fusionaron con el epítipo GFP. De acuerdo con los resultados anteriores, la transfección del cDNA de Alex3 en células HEK293AD conlleva a fenotipos de agregación mitocondrial, que varían entre una agregación mitocondrial suave en la que mitocondrias individuales son todavía visibles (52% de las células) y un fuerte fenotipo de agregación que conlleva a un único y gran agregado mitocondrial que localiza cerca del núcleo celular (39% de las células) (Figura 2a,b). La transfección con todos los constructos de cDNA de Alex3 deletados en C-terminal dieron lugar a unos fenotipos mitocondriales similares (Figura 2d,f). Resulta

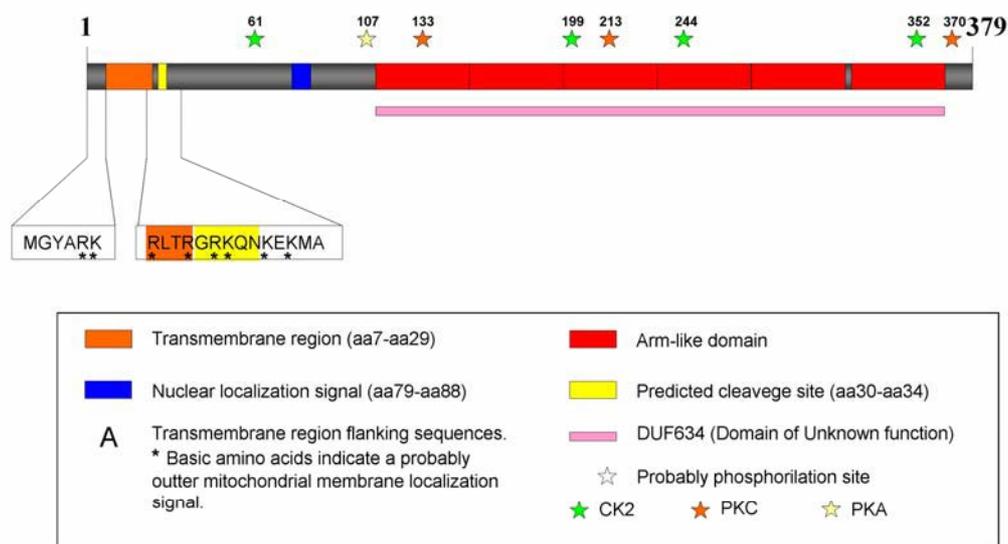


Figura 1: **Representación esquemática de la proteína Alex3.** Los dominios predichos fueron anotados en base a las bases de datos tales como Pfam, Smart o Wolfpsort y referencias bibliográficas. Las estrellas muestran la posición de los putativos lugares de fosforilación en serina o treonina.

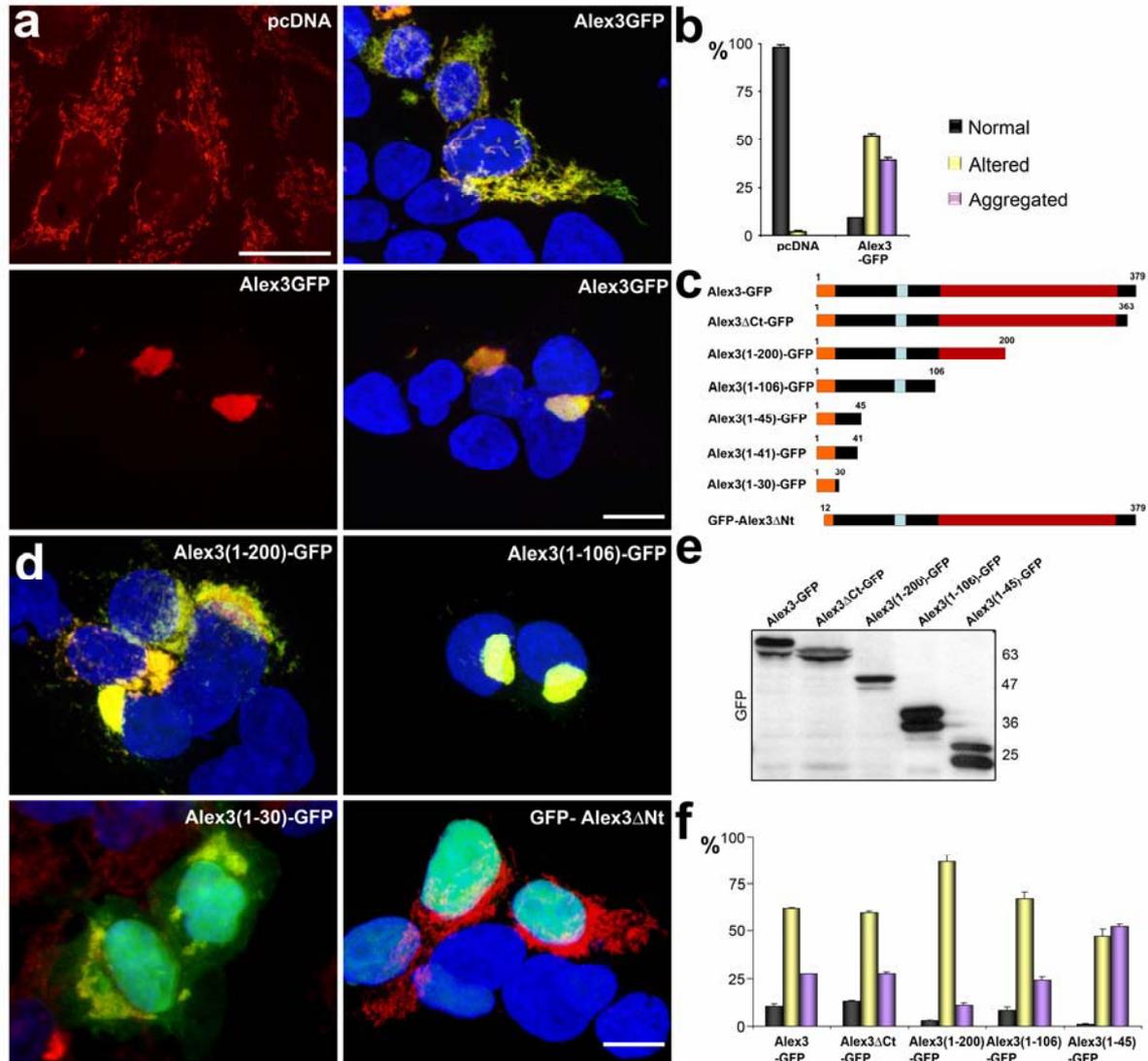


Figura 2: El dominio N-terminal de Alex3 es suficiente para inducir la agregación mitocondrial. (a) La sobreexpresión de Alex3GFP (verde) en células HEK293T induce severas alteraciones de la red mitocondrial cuando se compara con la expresión de un control pcDNA (panel superior izquierdo). El panel superior derecho ilustra una célula transfectada con Alex3 mostrando una morfología mitocondrial normal; los paneles inferiores muestran fenotipos mitocondriales agregados; la proteína Alex3 fue visualizada en verde y las mitocondrias en rojo con MitDsRed o MitoTracker. (b) Cuantificación y representación gráfica (media \pm desviación estándar) de los fenotipos mitocondriales en células control o sobreexpresantes de Alex3. (c) Esquema de los constructos delecionados de Alex3GFP usados para transfección. (d) Fotomicrografías ilustrando la expresión de los constructos Alex3(1-200)-GFP, Alex3(1-106)GFP, Alex3(1-30)-GFP que resultan en agregación mitocondrial; en contraste, la deleción de los primeros 12 aa localizan la proteína Alex3 en el núcleo. (e) WB mostrando los constructos truncados Alex3-GFP en los tamaños predichos. (f) Cuantificación y representación gráfica (media \pm desviación estándar) de los fenotipos mitocondriales después de la transfección con diferentes constructos truncados para Alex3-GFP, demostrando que todos los constructos contienen la región N-terminal que provoca la agregación mitocondrial. Barra de escala: 10 μ m.

interesante que encontramos que incluso el constructo más pequeño que contenía únicamente los 30 primeros aa N-terminales, resultaba en unos fenotipos mitocondriales idénticos, indicando que esta región N-terminal es suficiente para tanto la localización como la agregación mitocondrial (Figura 2d). Al contrario, la transfección con un cDNA de Alex3 al que le faltaba únicamente los primeros 12 aa N-terminales prevenía completamente la localización (y agregación) mitocondrial, indicando que la región N-terminal, donde el

dominio transmembrana y la señal de localización de la membrana mitocondrial externa está predicha, es necesaria para enviar a la proteína Alex3 a la mitocondria (Figura 1).

La vía de señalización de Wnt regula los niveles de proteína de Alex3 y la agregación mitocondrial

La secuencia de la proteína Alex3 contiene 6 dominios similares a armadillo dispuestos en la región C-terminal (Figura 1). Algunos estudios previos han sugerido un putativo enlace entre proteínas mitocondriales y la vía de señalización de Wnt/ β -catenina (Brocardo et al., 2008; Mezhybovska et al., 2009). Entonces nosotros investigamos si las proteínas Wnt afectaban los fenotipos mitocondriales inducidos por Alex3. Encontramos que los fenotipos de agregación provocados por la expresión de Alex3 eran dramáticamente revertidos por la co-transfección de células HEK293AD con el cDNA de Wnt1, que produce un fenotipo de desagregación frente a células HEK293 transfectadas con Alex3 sólo (Figura 3b,c). En contraste, el tratamiento con otro miembro de la vía de señalización canónica de Wnt, Wnt3a, no revertía los fenotipos mitocondriales (no mostrado y Figura 4a). Posteriormente analizamos si los componentes de la señalización no-canónica de Wnt afectaban los fenotipos mitocondriales inducidos por Alex3. Observamos que la co-transfección de Alex3 con los cDNAs del receptor Fz2, Wnt5a o Wnt11, tenían efectos intermedios en los fenotipos de agregación, en comparación con los de la proteína canónica Wnt1 (Figura 3d,e,f). Una evaluación cuantitativa de los fenotipos mitocondriales vistos después de la transfección con diferentes miembros y componentes de Wnt soportaba esta idea mostrada en la Figura 3g.

Durante el curso de los experimentos descritos arriba, nos dimos cuenta que las señales de inmunofluorescencia parecían decrecer después de la transfección con Wnt1 y Fz2 (ver Figura 3c,d). Para apoyar esta observación realizamos análisis de Western Blot en lisados de células HEK293AD transfectadas. Primero, confirmamos que la transfección con los cDNAs de Wnt1 o Wnt3a, o la incubación con la proteína Wnt1, estabilizaban los niveles de β -catenina indicando que estos factores extracelulares eran funcionales. Después, nosotros medimos los niveles de la proteína Alex3 por Western-Blot. Como se muestra en la Figura 4a, mientras que la transfección o incubación con Wnt1 conlleva a una fuerte disminución en los niveles de Alex3, tratamientos con Wnt3a no tiene efecto en los niveles de la proteína Alex3. Además, nosotros encontramos que Fz2 provoca una fuerte disminución en los niveles de Alex3; en contraste, los miembros no-canónicos de Wnt Wnt5a y Wnt11 producen suaves disminuciones de la proteína Alex3 que varían entre un ~20-50% (Figura 4b). En conjunto, estos hallazgos indican que la vía de señalización canónica de Wnt (Wnt1), y en una menor medida los miembros no-canónicos, conllevan a una marcada disminución en los niveles de proteína de Alex3 que a su vez resultan en prácticamente una reversión de los fenotipos inducidos por Alex3 sobre la agregación mitocondrial.

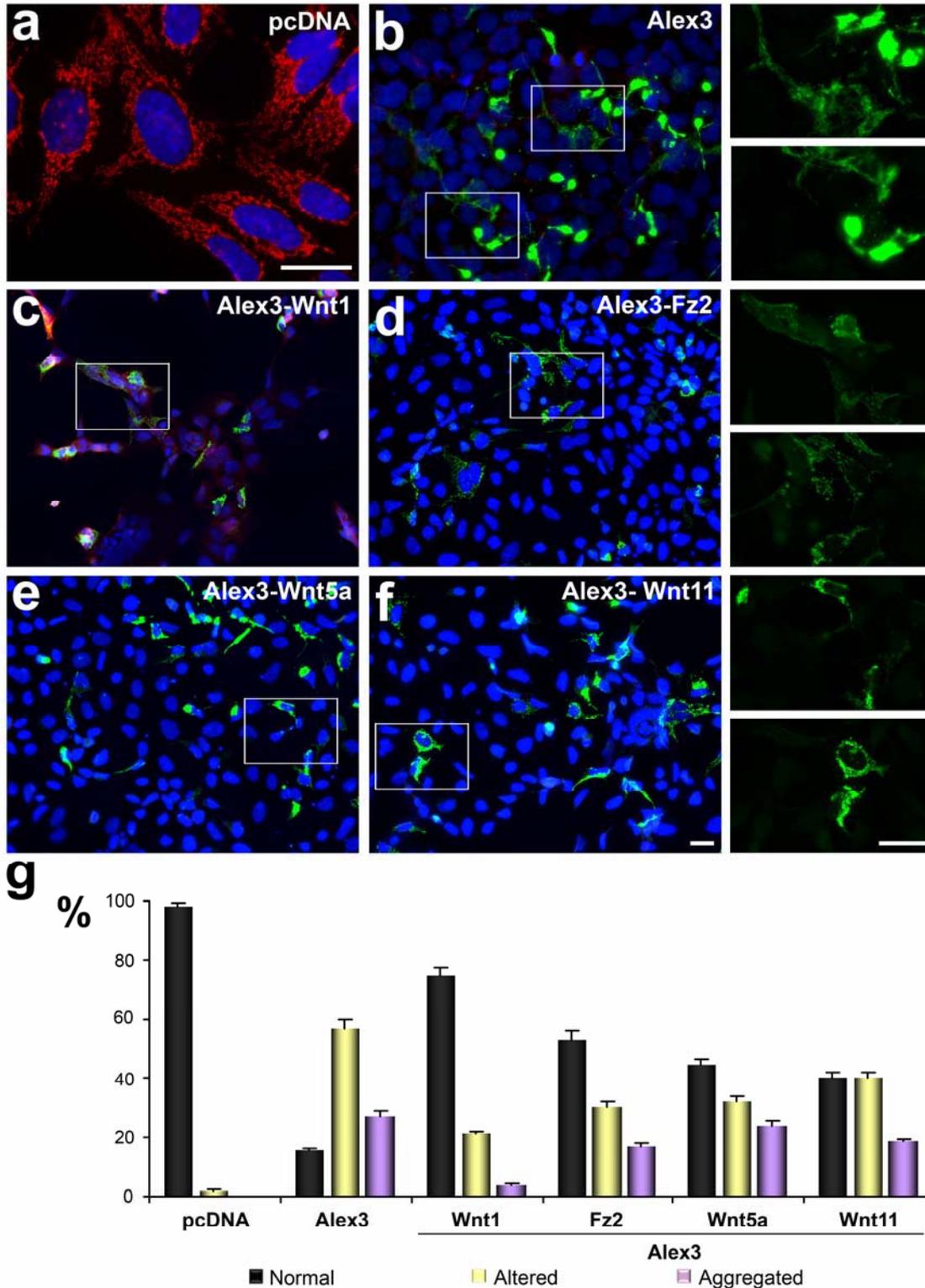


Figura 3: La señalización Wnt/Frizzled reestablece el fenotipo mitocondrial normal en células sobreexpresantes de Alex3. (a-f) La co-expresión de Alex3 (verde) y diferentes miembros de la vía de señalización Wnt/Frizzled (Wnt1, Fz2, Wnt5a y Wnt11) invierten los fenotipos de agregación mitocondrial inducidos por la sobreexpresión de Alex3 en células HEK293AD. Las áreas recuadradas son mostradas en una magnificación mayor a la derecha. (g) Cuantificación y representación gráfica (media \pm desviación estándar) de los fenotipos mitocondriales que resultan tras la transfección con diferentes Wnts y Fz2. Barra de escala: 10 μ m.

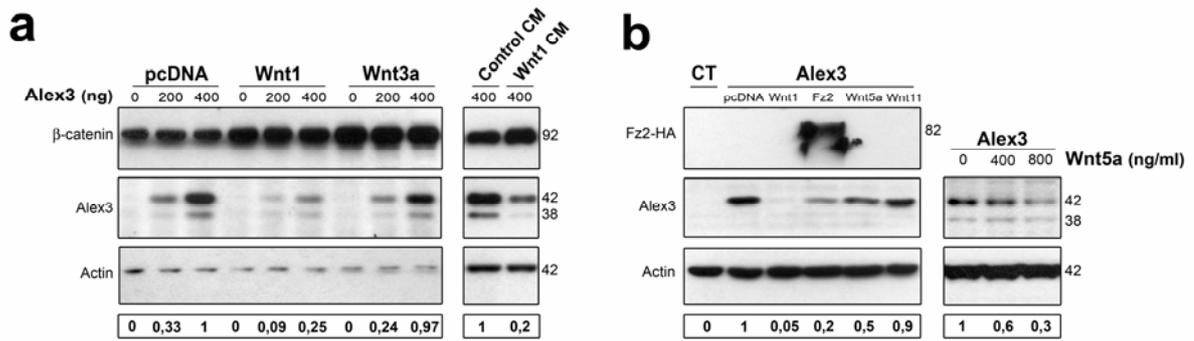


Figura 4: **La vía de Wnt/Frizzled induce la degradación de la proteína Alex3.** (a) WBs mostrando que Wnt1, pero no Wnt3a, induce la degradación de la proteína Alex3. Ambos, la transfección con un cDNA de Wnt1 (izquierda) y la incubación con medio condicionado de Wnt1 (CM, derecha), provocan la degradación de Alex3. (b) WB mostrando que la co-transfección con Wnt1, Fz2, Wnt5a y Wnt11 resulta en diferentes reducciones en los niveles de Alex3 (izquierda). El tratamiento con Wnt5a recombinante también induce la degradación de Alex3 de manera dependiente de concentración (derecha).

Los niveles de Alex3 no están regulados por los componentes “downs-stream” de la vía de señalización canónica Wnt/β-catenina

A continuación investigamos si los componentes de la vía canónica de Wnt, que son conocidos por activar la vía de β-catenina, afectaban los niveles de la proteína Alex3. Primero, encontramos que la co-transfección de Alex3 con la forma constitutivamente activa β-catenina S33A (Liu et al., 2002) no reproducía la degradación de Alex3 (Figura 5a,b). De acuerdo con estos resultados también observamos que las células HEK293AD con altos niveles de β-catenina estabilizada poseían fenotipos mitocondriales agregados inducidos por Alex3 que eran similares a los observados después de la transfección del cDNA de Alex3 solo (ver arriba). Posteriormente, observamos que la transfección con Disheveled2, que también activa la vía canónica de Wnt/β-catenina, también era inefectiva en prevenir la disminución de los niveles de Alex3 (Figura 5d).

Finalmente, la incubación con 2 inhibidores de la actividad enzimática de GSK3β, LiCl o SB216763, no previenen tampoco la degradación inducida por Wnt1 sobre Alex3 (Figura 5c). En conjunto, estos experimentos indican que la activación de diferentes componentes intracelulares de la vía canónica de Wnt no son suficientes para producir la degradación de Alex3, ni para alterar la degradación de Alex3 inducida por tratamientos de Wnt1.

PKC regula la degradación de Alex3

A continuación estudiamos si la degradación de Alex3 inducida por Wnt1 era dependiente del proteosoma. Encontramos que la inhibición del proteosoma con MG-132 incrementa los niveles de la proteína Alex3 en ausencia de Wnt1 (Figura 6a,b). Sin embargo, el mismo inhibidor no alteró la degradación de Alex3 inducida por Wnt1 (Figura 6a).

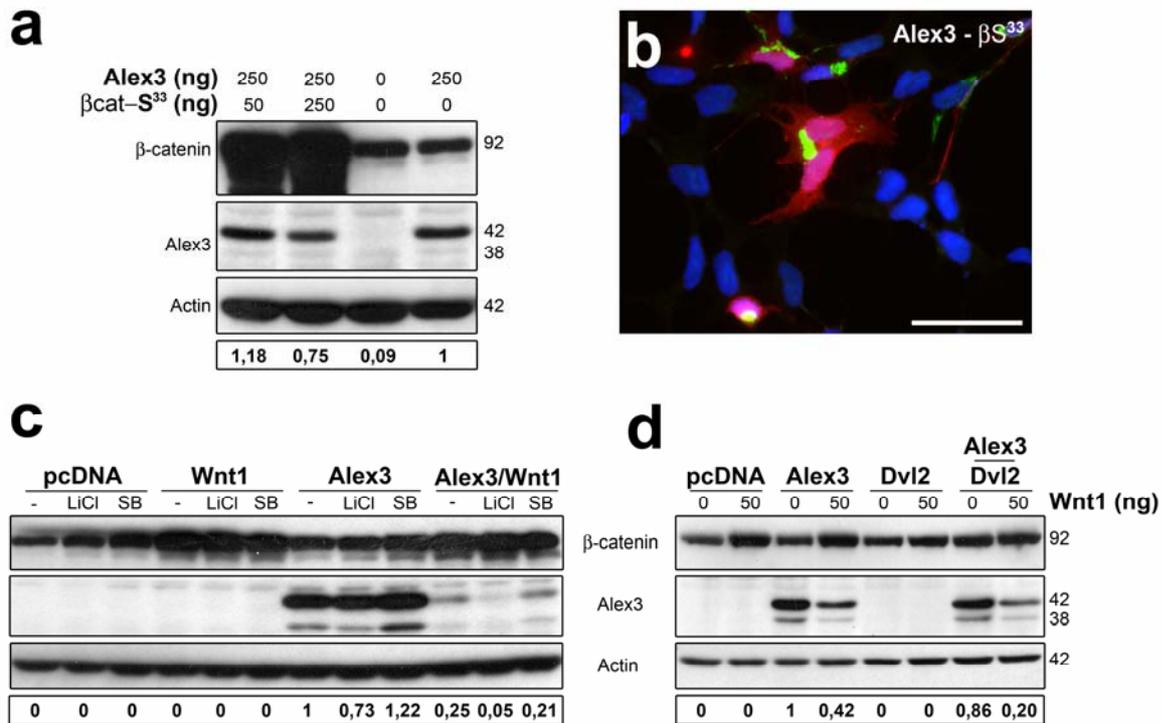


Figura 5: La degradación de Alex3 es independiente de la vía canónica de Wnt/ β -catenina. (a,b) La β -catenina constitutivamente activa ni induce la degradación de Alex3 como se ve en WB (a) ni revierte los fenotipos mitocondriales agregados inducidos por la sobreexpresión de Alex3 (b). (c,d) Ni la inhibición de GSK3 β con 10mM LiCl o con 10 μ M SB212763 (c) ni la co-transfección con Dvl2 (d) induce la degradación de la proteína Alex3. La transfección con Wnt1 fue usada como control para la degradación de Alex3. Barra de escala: 10 μ m.

Los resultados descritos arriba sugieren que las vías de señalización que conllevan a una degradación de Alex3 están “up-stream” de los componentes testados arriba (β -catenina, GSK3 β y Disheveled2). A continuación comprobamos el impacto de vías de señalización adicionales no-canónicas, las cuales han sido demostradas de ser activadas por la cascada de Wnt, tales como la vía de Wnt/Planar Cell Polarity (PCP) Jun kinasa o la vía de Wnt/Ca²⁺ (Smalley and Dale, 1999; Nusse, 2005; van Amerongen and Nusse, 2009). Sin embargo, la inhibición de Jun kinasa (con SP600125), CAMKII (KN62) y Calcineurina (Cypermetrina), los tres conocidos componentes “down-stream” de las vías PCP y Ca²⁺, no reducían la degradación de la proteína Alex3 causada por Wnt1 (Figura 6c).

A menudo, la fosforilación/defosforilación señala a las proteínas para la degradación (Liu et al., 2002). La secuencia de la proteína Alex3 tiene diferentes lugares putativos para la fosforilación por CK2, PKA y PKC, todos ellos “down-stream” efectos de la vía de Wnt (Figura 1). A continuación testamos si la inhibición de estas kinasas afectaba la degradación de Alex3. Encontramos que la inhibición de CK2 (usando CK2 inhibitor-1) reduce los niveles de la proteína Alex3, e incrementa la degradación de Alex3 inducida por Wnt1 (Figura 7a), sugiriendo que la defosforilación de Alex3 puede activar su degradación. A continuación, encontramos que la activación de PKC por TPA evitaba completamente la degradación de Alex3 mediada por Wnt1 (Figura 7c). Al contrario, la inhibición de PKC por CalphostinC o

usando un quelante intracelular de Ca^{2+} BAPTA/AM aumentaba ligeramente (no previno) la degradación de Alex3 inducida por Wnt1 (Figura 7b,d). Resulta interesante que el bloqueo de PKC en ausencia de Wnt1 era suficiente para reducir los niveles de la proteína Alex3. Estos hallazgos sugieren un papel principal de PKC en el control y degradación de los niveles de proteína de Alex3 dependiente e independientemente de Wnt1. Además, observamos que el tratamiento con TPA en células HEK293AD fue suficiente para prevenir la desagregación de los fenotipos mitocondriales inducida por Wnt1 (Figura 7e,f).

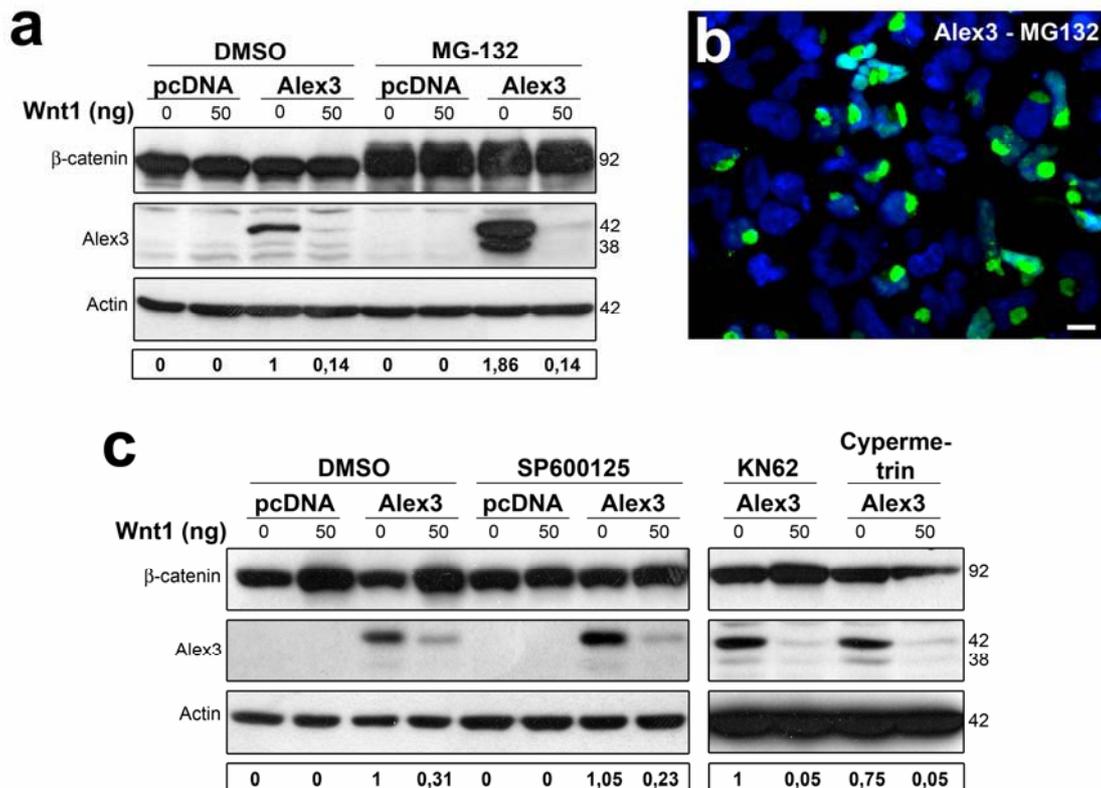


Figura 6: **La degradación de Alex3 por Wnt1 es independiente del proteosoma, JNK, CMAKII y Calcineurina.** (a) La inhibición del proteosoma con el tratamiento $10\mu\text{M}$ MG-132 bloquea la degradación normal de Alex3 pero no la inducida por Wnt1. (b) Numerosas células HEK293AD transfectadas con el inhibidor proteosomal muestran el fenotipo de agregación más severo. (c) La inhibición de JNK con $10\mu\text{M}$ SP600125 (efector downstream de la vía Wnt/PCP), CAMKII con $25\mu\text{M}$ KN62 o Calcineurina con $10\mu\text{M}$ Cypermetrin (efectores downstream de la vía Wnt/ Ca^{2+}) no inducen la degradación de la proteína Alex3. Barra de escala: $10\mu\text{m}$.

Wnt1 regula la dinámica mitocondrial dependiente de Alex3 a través de mecanismos dependientes de PKC

La sobreexpresión de Alex3 en células HEK293 conlleva a una agregación mitocondrial y a una reducción de la motilidad mitocondrial. Para investigar si Wnt1 altera estos fenotipos, nosotros filmamos la motilidad mitocondrial realizando grabaciones de video. Células HEK293 control muestran una red densa de mitocondrias que se mueve de manera dinámica, similar a como ha descrito (Yi et al., 2004)(Figura 8a). La sobreexpresión de Alex3 resulta en la progresiva agregación de las mitocondrias individuales en grandes clusters cerca

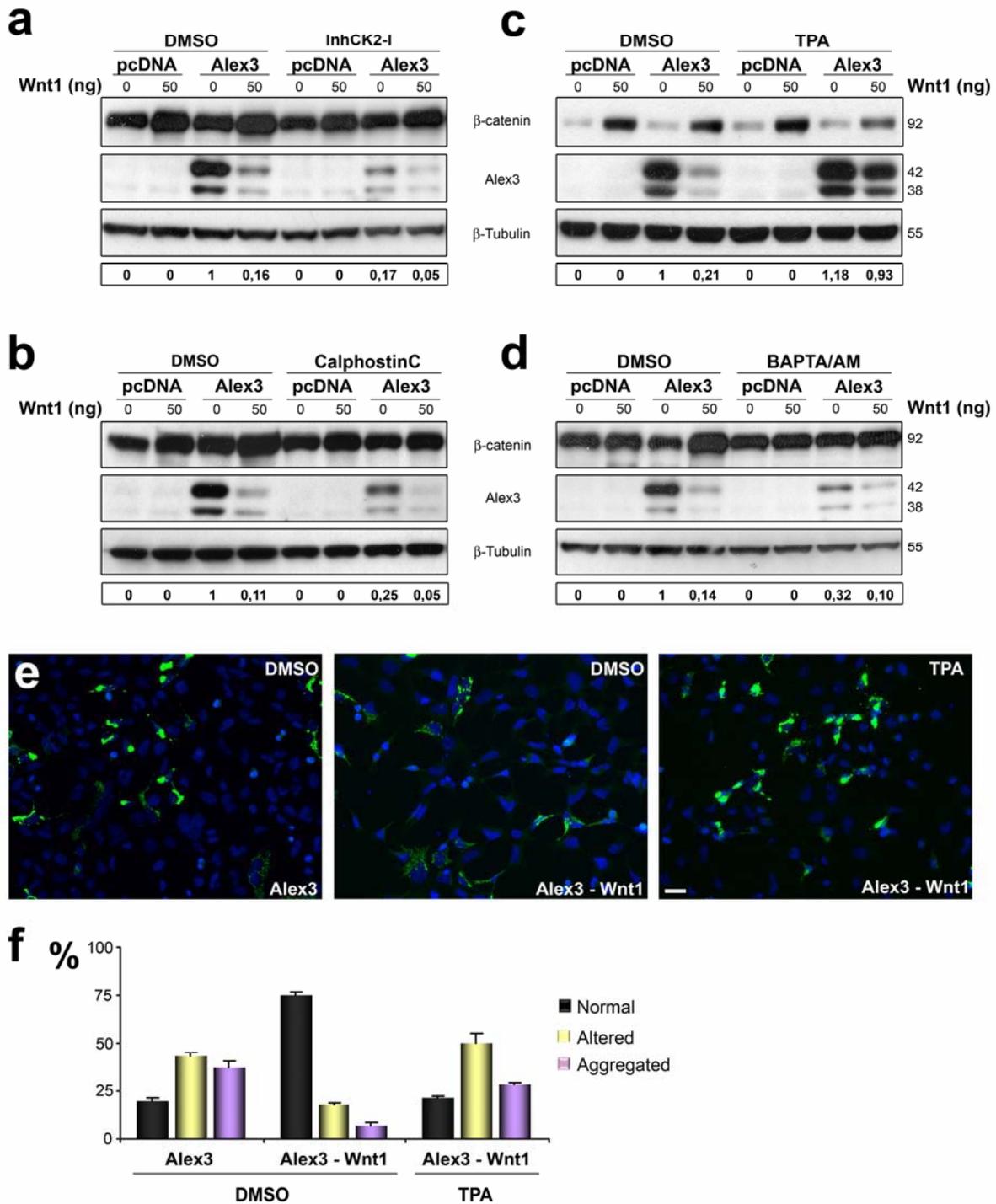


Figura 7: La fosforilación por PKC y CKII protege frente a la degradación Wnt/Frizzled de Alex3. (a,b) La inhibición de CKII (con 100µM casein kinase II inhibitor I) y PKC (con 1µM Calphostin C), efectores downstream de la vía de señalización de Wnt, son suficientes para producir la degradación de Alex3. (c) En contraste, la activación de PKC con 1µM TPA protege contra la degradación inducida por Wnt1 de la proteína Alex3. (d) El tratamiento con 20µM BAPTA/AM, un quelante intracelular de calcio, también reproduce la degradación por PKC. (e) Fotomicrografías demostrando que el tratamiento con TPA previene la degradación de Alex3 inducida por Wnt1 y la inversión a los fenotipos mitocondriales normales. (f) Cuantificación y representación gráfica (media ± desviación estándar) de los fenotipos mitocondriales en HEK293AD en las condiciones mostradas en (e); Destaca que la incubación con TPA previene el rescate de los fenotipos mitocondriales inducidos por Wnt1. Barra de escala: 10µm. La cuantificación de los niveles de la proteína Alex3 está mostrada debajo.

del núcleo, que exhiben una marcada reducción en su dinámica (motilidad) (Figura 8b). De acuerdo con los resultados mostrados arriba, la transfección con el cDNA de Wnt1 disminuye los niveles de la proteína Alex3 en células HEK293T; además, la activación por Wnt1 restablece la motilidad y dinámica mitocondriales a los niveles basales (Figura 8c). Por último, este fenotipo mitocondrial revertido es evitado por el tratamiento con el activador de PKC TPA en células HEK293T co-transfectadas con Alex3 y Wnt1, que nuevamente exhiben grandes clusters mitocondriales con reducida motilidad (Figura 8d). En conjunto estos hallazgos sugieren que Wnt1 no solo controla los niveles de la proteína Alex3, sino que también la dinámica y motilidad mitocondrial en una forma dependiente de PKC.

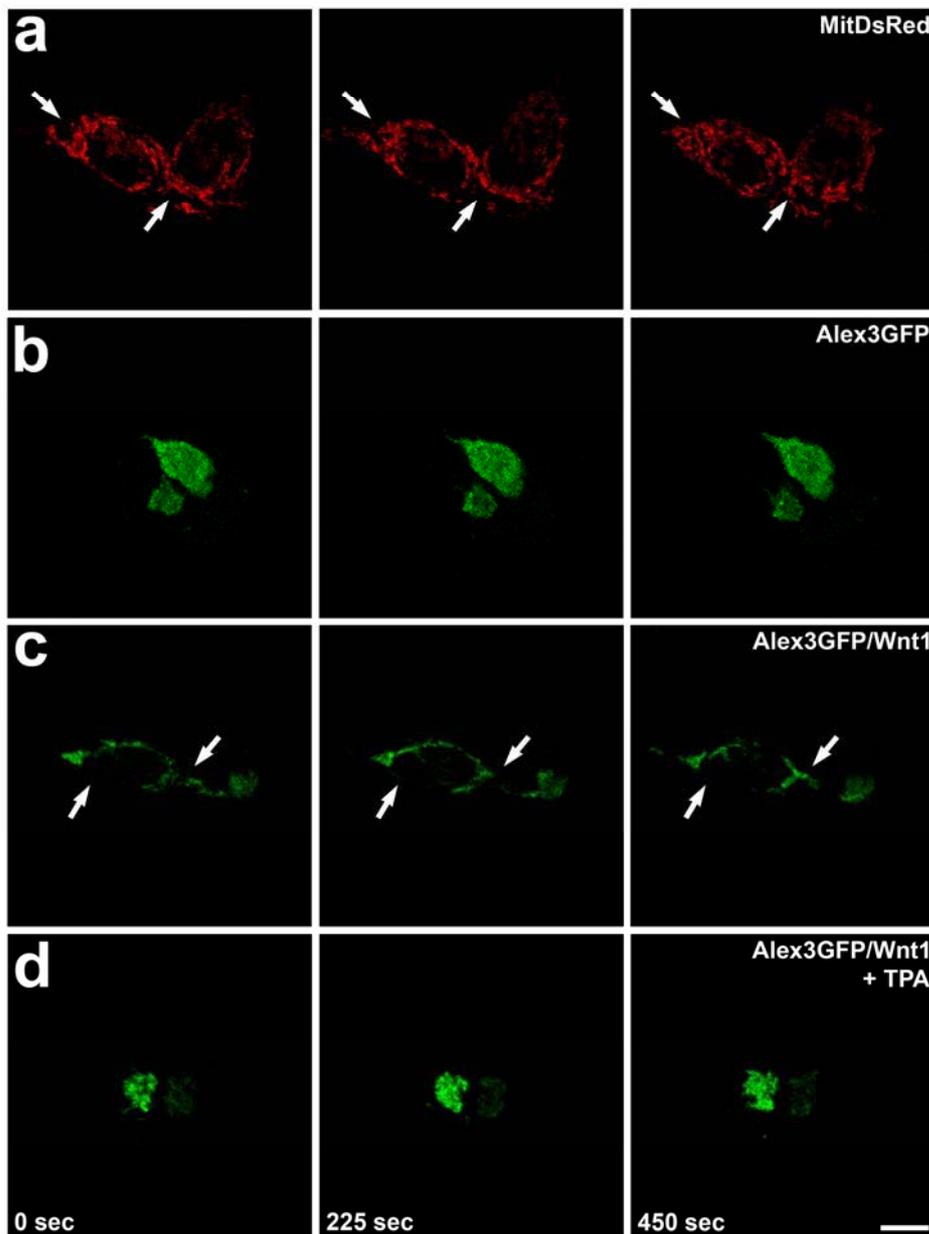


Figura 8: Wnt1 incrementa la motilidad y dinámica mitocondrial. Series de imágenes confocales representativas, tomadas cada 225 segundos, a partir de células HEK293T vivas sobreexpresando la proteína localizada en mitocondrias MitDsRed (a), la proteína fusionada Alex3GFP (b), o Alex3GFP y Wnt1 cDNAs (4:1) (c,d). En (d) el tratamiento con TPA fue usado para activar PKC. Las flechas identifican áreas con una alta dinámica mitocondrial. Mientras la motilidad mitocondrial es alta en las condiciones control (a) y Alex3GFP/Wnt1 (c), esta está severamente reducida en las células sobreexpresantes de Alex3-GFP (b) y en las células tratadas Alex3GFP/Wnt1/TPA (d). Barra de escala: 10 μ m.

Capítulo III: La proteína Armc10/SVH (ancestro de la familia Armcx) también regula la dinámica mitocondrial e interacciona con el complejo KHC/Miro/Trak2.

Caracterización de la proteína Armc10.

La secuencia de la proteína Armc10, a diferencia de las proteínas Armcx que están codificadas por un único exón, esta codificada por 7 exones localizados en el cromosoma 7q11.22 (Huang et al., 2003). Debido al splicing alternativo en los exones 2, 5 y 6, existen por lo menos 6 isoformas de la proteína Armc10 (A-F) (Figura 1), de las cuales se ha demostrado la expresión de 4 de ellas (A-D) (Huang et al., 2003). Todas estas isoformas, de manera similar a las proteínas del cluster Armcx, poseen un dominio transmembrana en el extremo N-terminal (aa 7-29), un probable lugar de cleavage (aa 30-36) y una secuencia flanqueante con una alta basicidad en uno de los extremos de su región transmembrana similar a las que

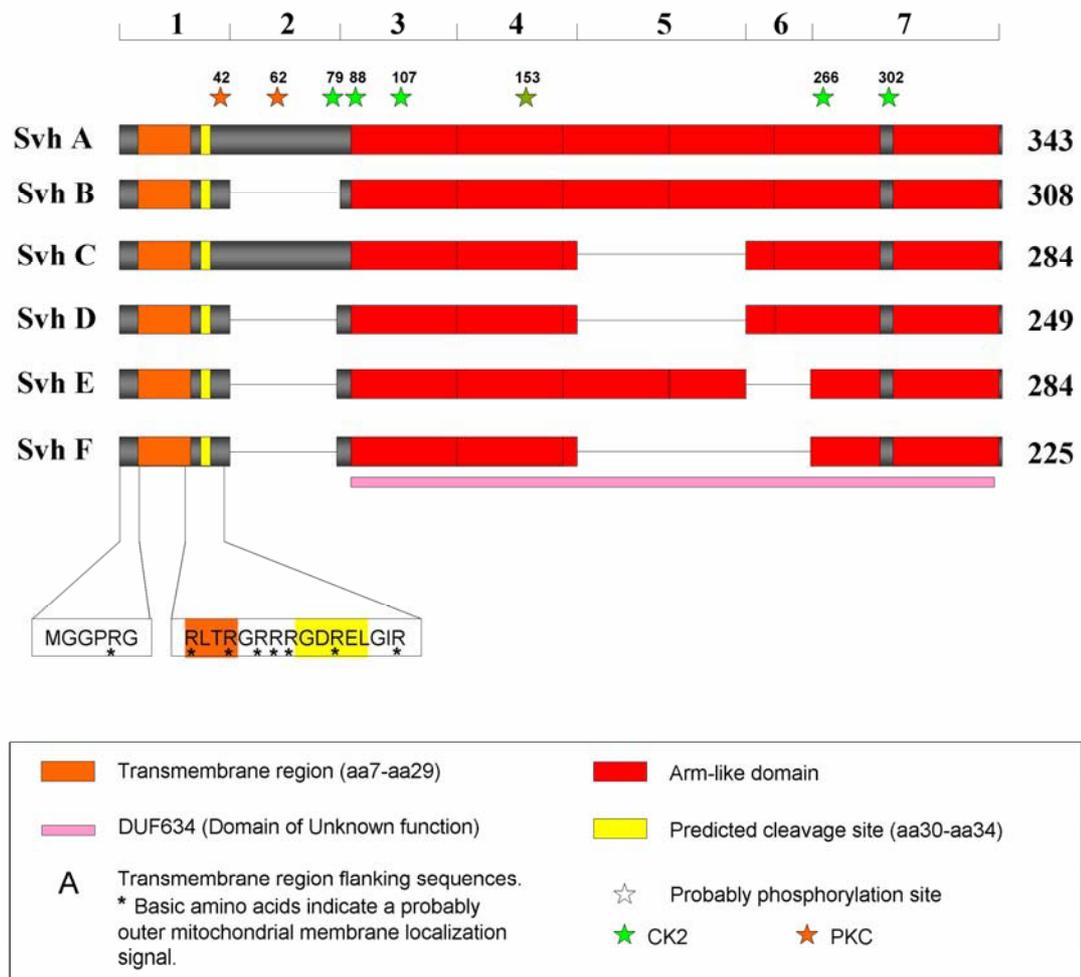


Figura 1: **Representación esquemática de las diferentes isoformas de la proteína Armc10 (Svh).** Los dominios predichos fueron anotados en base a las bases de datos tales como Pfam, Smart o Wolfpsort y referencias bibliográficas. Las estrellas muestran la posición de los putativos lugares de fosforilación en serina o treonina (notar que el residuo 153 es putativo lugar de fosforilación para CK2 y PKC). Números en la parte superior: exones. Números en la parte derecha: longitud aminoacídica de la proteína.

poseen las proteínas Tom20 y Bcl-w, la cual predice una posible localización en la membrana mitocondrial externa (Rapaport, 2003). La proteína Armc10 full-length (isoforma A) posee 6 dominios armadillo, incluidos en el dominio DUF634 (aa 85-337), que pueden estar completos o parcialmente deletados en las otras isoformas (Figura 1), así como varios potenciales sitios de fosforilación para la proteína kinasa C y CKII.

La expresión del gen Armc10 ha sido caracterizada por estar ampliamente distribuida en varios tejidos, incluyendo placenta, hígado, riñón, corazón y cerebro (Huang et al., 2003). Para profundizar en la localización de la proteína Armc10, hicimos uso del anticuerpo Rabbit anti-Armc10 HPA011057 (Sigma-Aldrich). Primero comprobamos la especificidad del anticuerpo, realizando análisis de WB contra lisados de células HEK293T (Figura 2a). En estos estudios pudieron identificarse hasta 4 bandas, con pesos moleculares que podrían corresponder a 4 o 5 de las isoformas de la proteína (Pesos moleculares de las isoformas A-E: 37,5 Kda isoforma A; 33,8 Kda isoforma B; 31 Kda isoforma C y E y 27,4 Kda isoforma D).

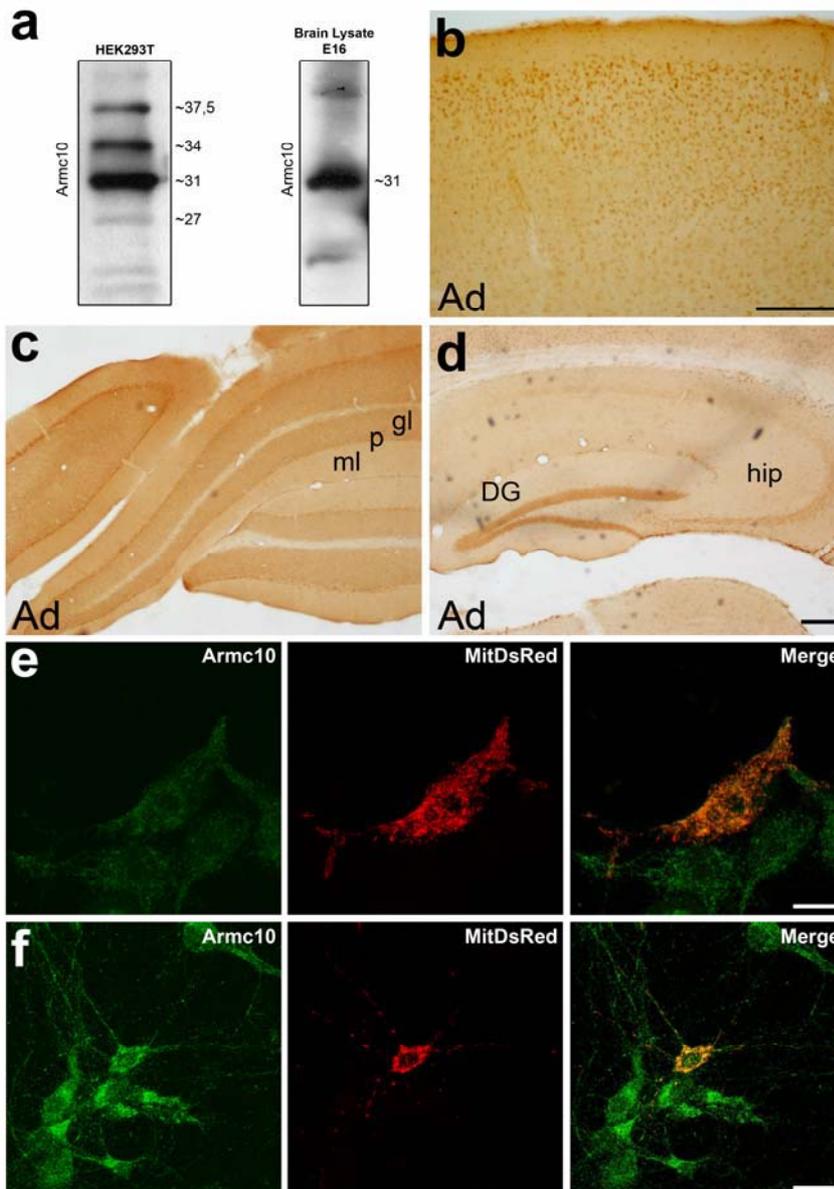


Figura 2: Expresión y localización de la proteína Armc10.

(a) El anticuerpo anti-Armc10 específicamente reconoce la proteína Armc10 endógena. El anticuerpo reconoce cuatro especies específicas de alrededor de 37,5; 33,8; 31 y 27,4 KDa en células HEK293T, como se muestra en el Western blot (panel de la izquierda). En lisados de cerebro murino de estadio E16 el anticuerpo detecta una única especie de alrededor de 31 KDa (panel de la derecha). (b,c,d) Secciones coronales de cerebro de ratón adulto muestran los patrones de expresión de la proteína Armc10 (b) en el neocórtex (c) en el cerebelo (d) o en el hipocampo. (e,f) Imágenes confocales mostrando que la proteína Armc10 endógena (verde) colocaliza con las mitocondrias (e) en células HEK293T (f) o en neuronas hipocámpales en cultivo a 7 DIV; las células fueron transfectadas con MitDsRed (rojo). Abreviaciones: Ad: Adulto; DG: giro dentado; gl: capa granular; hip: hipocampo; ml: capa molecular; p: células de Purkinje. Barra de escala: 200 μ m (b,c,d); 10 μ m (e) y 20 μ m (f).

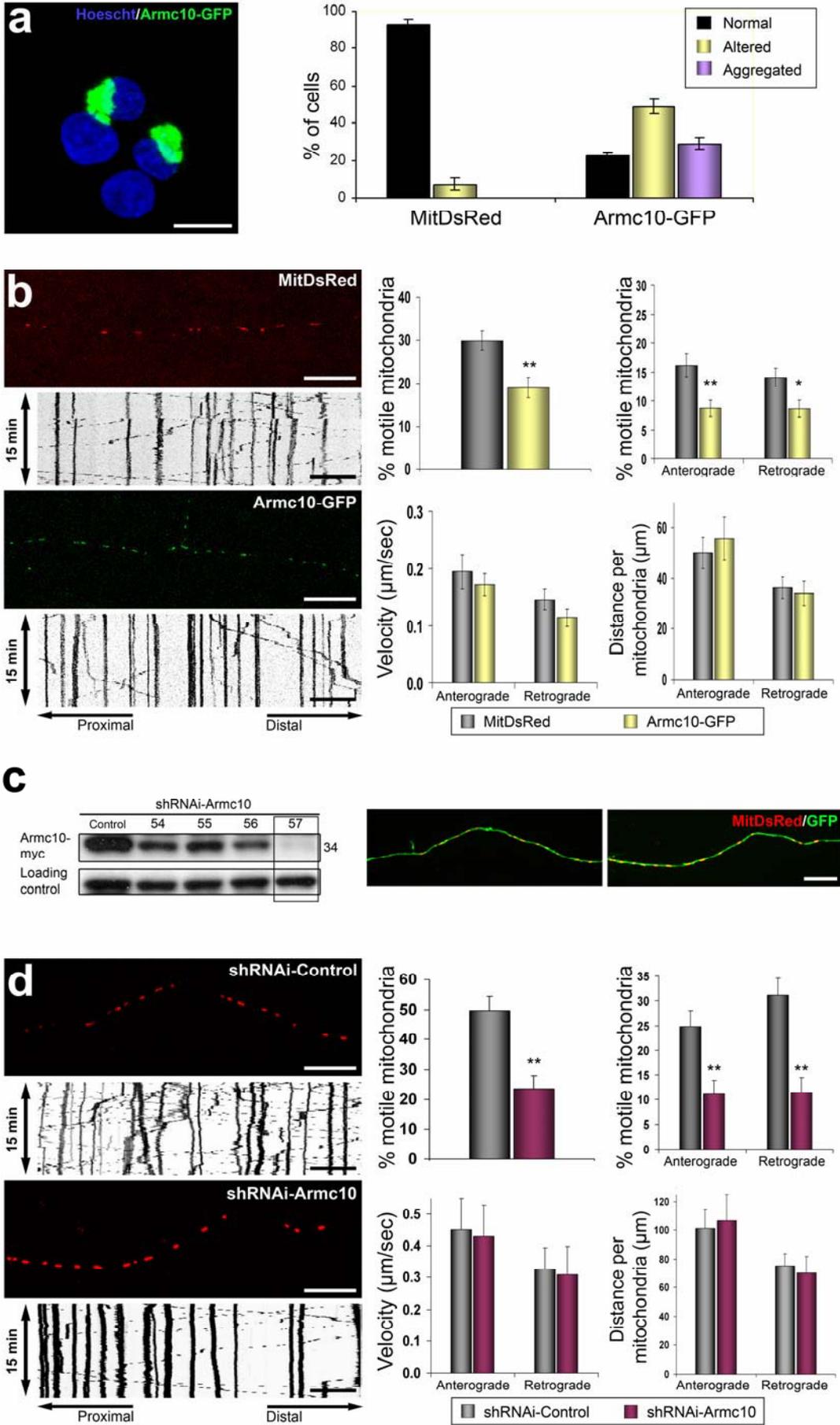
Una banda de peso aproximado a 31 Kda, también fue detectada en WBs de lisados de cerebro, especialmente en el estadio temprano E16 y que podría corresponder a las isoformas C y/o E (Figura 2a). Posteriormente, el patrón regional y celular del inmunomarcaje de la proteína Armc10 fue estudiado en secciones de ratón adulto, resultando idéntico al encontrado en los análisis de hibridaciones in situ (Capítulo I, Figura 1c), con la proteína Armc10 ampliamente expresada en la mayoría de las regiones especialmente en el hipocampo, corteza y cerebelo (Figura 2b,c,d). Resulta interesante destacar que estas marcas resultaron ser mayoritariamente nucleares, lo cual concuerda con la presencia de putativas señales de exportación nuclear (NES) (Zhou et al., 2007).

Debido a que estudios previos habían señalado una posible localización mitocondrial de la proteína Armc10 (Pagliarini et al., 2008)(Capítulo I, Figura 1c), se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en células HEK293T y cultivos neuronales de hipocampo con el mismo anticuerpo (Figura 2e,f), que corroboraron la predominante localización mitocondrial de la proteína Armc10 endógena. En conjunto estos datos muestran una localización bimodal (mitocondrial y nuclear) parecida a la de la proteína Alex3, y también muestra amplias similitudes con las proteínas localizadas en el cluster Armcx, lo que apunta a que pueda tener funciones similares en el sistema nervioso.

La proteína Armc10 regula la agregación y transporte mitocondrial.

Debido a las similitudes en los patrones de expresión y localización de las proteínas Armc10 y Alex3, resulto interesante demostrar si la proteína Armc10, ancestro del cluster Armcx, estaba también implicada en la regulación de la agregación y transporte mitocondrial. Para ello, hicimos uso de un vector codificante para la proteína Armc10 murina, correspondiente a la isoforma B y que posee los 6 dominios armadillo y que mostró nuevamente una localización mitocondrial. Células HEK293T fueron transfectadas con el cDNA de Armc10 fusionada en su extremo C-terminal con GFP y estudiado el fenotipo mitocondrial. Similar a la proteína Alex3, encontramos que el 88% de las células sobreexpresantes de la proteína Armc10 muestran fenotipos anormales, variando entre fenotipos fuertemente agregados (29%; aggregated) en los que había un gran y único agregado en la zona perinuclear (Figura 3a) y fenotipos intermedios (49%; altered), lo cual puede indicar un papel similar en la regulación de la agregación mitocondrial en línea celular.

Para investigar si la proteína Armc10 está también implicada en el transporte mitocondrial en axones, cultivos de neuronas hipocampales fueron transfectadas a 4DIV con MitDsRed o Armc10-GFP (Figura 3b) y después de 2 días, axones de neuronas vivas fueron identificados y grabados a lo largo de 15 minutos y la motilidad mitocondrial cuantificada por medio de kimografías como se describe previamente. En los cultivos control, alrededor de un 30% de mitocondrias presentaban movilidad a lo largo de los 15 minutos de grabación



(Página anterior) Figura 3: **Los niveles de la proteína Armc10 alteran la distribución mitocondrial y regulan el transporte axonal de las mitocondrias en neuronas hipocampales.** (a) La sobreexpresión de Armc10-GFP en células HEK293T induce severas alteraciones en la morfología y distribución de la red mitocondrial. Nosotros clasificamos estos efectos en una escala de 3 puntos desde cambios no sustanciales, hasta el fenotipo más severo (ver Métodos) que consiste en la completa agregación de la red mitocondrial en la región perinuclear, como se muestra en el panel de la izquierda. En el panel de la derecha, cuantificación y representación gráfica (media \pm desviación estándar) de las subpoblaciones mencionadas arriba de células sobreexpresantes de Armc10-GFP. (b,d) (Izquierda) Imágenes confocales y quimografías representativas del total del período de adquisición (i. e. 15 min. por película) de axones sobreexpresantes de la proteína mitocondrial MitDsRed o la proteína fusionada Armc10-GFP (b), o MitDsRed más un control shRNAi o un shRNAi específico de Armc10 (d). A la derecha representación gráfica del % de mitocondrias móviles, velocidad y distancia cubierta por mitocondrias individuales medidas en las quimografías para los experimentos de sobreexpresión (b) o silenciamiento (d). Todas las quimografías están formadas con el extremo axonal distal a la derecha y los datos representan la media \pm s.e.m de 12-21 axones (neuronas) por grupo experimental, de por lo menos 4 experimentos independientes. ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05. (c) Células HEK293T fueron transfectadas con un constructo de expresión de Armc10-myc y un vector pGFP-V-RS que contenía diferentes secuencias shRNAi específicas para Armc10 (54, 55, 56, 57) y un control shRNAi scrambled. La secuencia shRNAi recuadrada, 57, fue seleccionada para realizar todos los experimentos de silenciamiento. Los paneles de la derecha identifican el axón representado en (d) expresando GFP tras la transfección. Barra de escala: (a) 10 μ m y (b,c,d) 20 μ m.

(Hollenbeck and Saxton, 2005), mientras que el resto de mitocondrias permanecían estacionarias. Por el contrario, el transporte mitocondrial en las neuronas transfectadas con la proteína Armc10-GFP mostraban una disminución significativa del transporte mitocondrial en ambos sentidos, anterógrado y retrógrado (Figura 3b), aunque a diferencia de los resultados previos observados con la proteína Alex3, ni la velocidad ni la distancia recorrida por mitocondria resultaron afectadas (Figura 3b).

Para confirmar la noción de que la proteína Armc10 también regula el tráfico mitocondrial en neuronas, se realizaron experimentos de silenciamiento de la proteína endógena, transfectando los cultivos neuronales con una secuencia específica para la región C-terminal de Armc10 y presente en todas sus isoformas (57) (Figura 3c) o una secuencia control scrambled. Las neuronas expresantes del shRNAi para Armc10 eran viables y morfológicamente normales. Nuevamente, las neuronas silenciadas para Armc10 presentaban una reducción en la motilidad y tráfico mitocondrial en ambos sentidos, y nuevamente ni la velocidad ni la distancia recorrida por mitocondria se mostraron alteradas por el silenciamiento. En conjunto, estos datos muestran que los niveles de la proteína Armc10, al igual que los de Alex3, regulan la motilidad de las mitocondrias en cultivos hipocampales de neuronas.

Armc10 interaccionan con el complejo KHC/Miro/Trak2.

Finalmente, para confirmar si la regulación del tráfico mitocondrial por parte de la proteína Armc10 es similar al producido por Alex3, investigamos la posible interacción del ancestro del cluster Armcx, Amrc10, con el complejo regulador del tráfico mitocondrial en neuronas KHC/Miro/Trak2. Para ello, células HEK293T fueron co-transfectadas y ensayos de

inmunofluorescencia realizados, entre Armc10-GFP y las proteínas Miro2, Trak2 y KIF5C. Mientras estos estudios revelaron una fuerte colocalización con las proteínas Miro2 y Trak2, la proteína KIF5C muestra una colocalización parcial, posiblemente debida a la amplia localización de la proteína KIF5C en todo el citoplasma (Figura 4b).

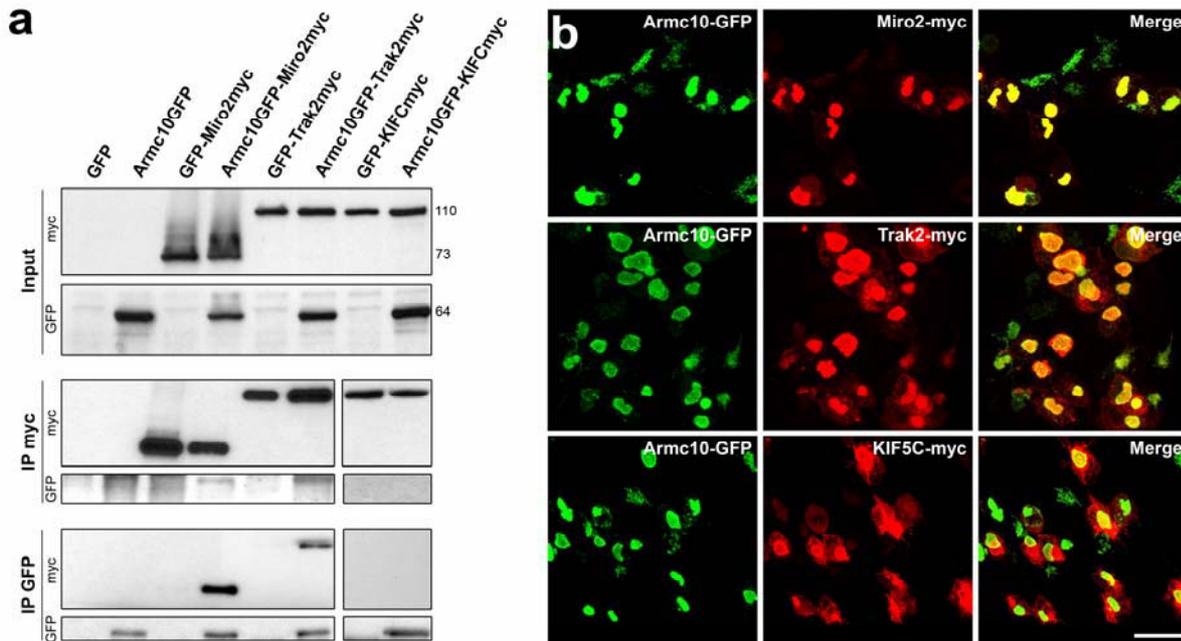


Figura 4: **Armc10 es un componente del complejo kinesina/Miro/Trak2 responsable del transporte mitocondrial a través de microtúbulos.** (a) Co-inmunoprecipitación de Armc10-GFP con Miro2myc, KIF5Cmyc o Trak2myc resulta en la interacción específica de Armc10-GFP con Miro2myc y Trak2myc pero no se detectó interacción entre Armc10-GFP y KIF5Cmyc. Un plásmido GFP fue usado como control. (b) Colocalización de Armc10-GFP (verde) con Miro2myc, Trak2myc o KIF5Cmyc (red) en células HEK293T co-transfectadas y procesadas para inmunocitoquímica. Los paneles de la derecha muestran una imagen 'merged' donde la colocalización (amarillo) de Armc10-GFP es aparente con Miro2myc y Trak2myc. Armc10-GFP y KIF5Cmyc comparten bajos niveles de colocalización. Barra de escala: 20 μ m.

Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación en células HEK293T transfectadas con Armc10-GFP y las proteínas Miro2, Trak2 o KIF5C fusionadas al epítipo myc (Figura 4a). Las proteínas Miro2 y Trak2 fueron detectadas por WB en lisados inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-GFP y a la inversa, la inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-myc permitían detectar la proteína Armc10. En contraste, no fue posible detectar la co-inmunoprecipitación de Alex3-GFP con KIF5C-myc ni viceversa. En conjunto, los datos mostrados arriba demuestran que el ancestro del cluster Armcx, Armc10, también interacciona con el complejo Miro/Trak2, de forma similar a la que lo hace la proteína Alex3.

Capítulo IV: Generación de modelos in vivo. Resultados preliminares

Para profundizar en el estudio de los genes *Armcx* se ha llevado a cabo la generación de cepas de ratones deficientes para estas proteínas con el objetivo de poder estudiar un modelo ‘in vivo’ en el que estén participando. Para la generación de los animales se han seguido dos modelos, la generación de ratones knock-out condicionales para la proteína Alex3 y la generación de animales knock-downs mediante la inyección de lentivirus que expresan shRNAs específicos para las proteínas *Armcx*/*Armc10*.

Generación del ratón Knock-out condicional para Alex3

La generación del ratón Knock-out para Alex3 se está llevando a cabo con la colaboración del servicio “Mouse Mutant Core Facility” del Instituto de Recerca Biomédica de Barcelona. Para ello, la estrategia utilizada es la de direccionamiento génico (gene targeting) mediante técnicas de recombinación. En una primera fase, se generó un gen condicional para *Armcx3* en el vector PGK-DTA. El gen *Armcx3* contiene 5 exones, con su quinto exón codificando para la totalidad de la proteína Alex3. Flanqueando este exón se insertaron dos secuencias LoxP que constituirán la secuencia condicional en los ratones Knock-out y también se añadió un cassette flanqueado por secuencias FRT con un gen reportero LacZ y con el gen de resistencia a Neomicina para la posterior selección clonal (Figura 1).

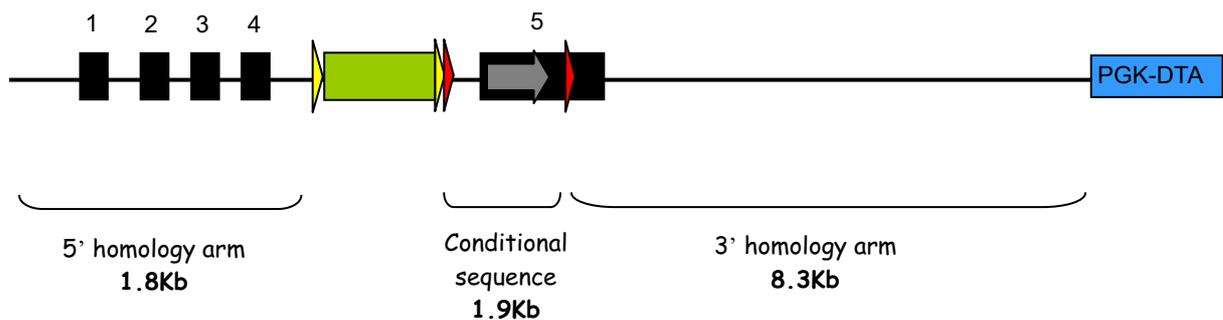


Figura 1: Estructura del vector usado para la generación del ratón knock-out para la proteína Alex3. El gen *Armcx* fue clonado en el vector PGK-DTA (rectángulo azul). La región del exón 5 (rectángulo negro), que contiene la secuencia codificante completa de Alex3 (flecha gris), está flanqueada por los lugares específicos de la recombinasa Cre, LoxP (triángulos rojos). Esta secuencia está precedida por el gen reportero LacZ y un gen de resistencia a Neomicina (rectángulo verde) que permitirá la selección de las células ES y que será deletada a través del cruce con Flp recombinasa que reconocerá las secuencias específicas FRT (triángulos amarillos).

Este vector fue transfectado en células madre murinas (ES cells) que, mediante recombinación homóloga, sustituirán el gen *Armcx3* endógeno por el gen condicional *Armcx3*. A continuación se procedió a la selección de los clones positivos para este proceso mediante diversos métodos, como PCR o Southern Blot (Figura 2). Para la obtención de los

modelos murinos, se ha procedido, como paso previo, a la generación de ratones “quimera”. Para ello, se han inyectado las ES positivas en cepas de ratón sobreexpresantes para la Flp recombinasa que permitirán extraer el cassette de selección LacZ/Neo. Posteriormente, se procederá a la obtención de ratones que expresen el gen *Armxc3* condicional en todo el animal. Con este diseño se pretenden obtener cepas de ratones que, por cruzamiento con cepas que expresen el gen recombinasa CRE bajo diferentes promotores específicos de tejido y estadio celular, permitan controlar los tejidos en los que el gen estará delecionado sin verse afectada la expresión de la proteína en el resto del animal.

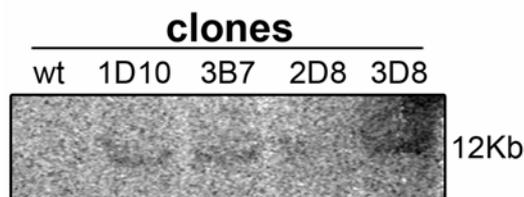


Figura 2: Screening por Southern Blot de células ES. Una sonda de 571pb específica para el gen de resistencia a Neomicina fue usada contra DNA digerido por el enzima de restricción *ScaI* proveniente de diferentes clones positivos por PCR para el gen condicional *Armxc3*. Como se observa en la imagen una banda del tamaño esperado (12Kb) fue claramente detectada para los clones 1D10, 3B7 y 3D8.

Generación de ratones knock-downs para los genes *Armxc/Armc10*

La Generación de los ratones knock-downs se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Carlos Lois de la “Universty of Massachusetts. Medical School”, mediante el uso de la técnica de inyección de lentivirus en el espacio perivitelino de embriones en estadios de una célula, tal y como describe (Lois et al., 2002). Esta técnica se ha demostrado efectiva para la generación de animales transgénicos entre ellos ratones (Lu et al., 2004).

Brevemente, para la generación de estos ratones, se comprobó el funcionamiento de secuencias shRNAs para los genes *Armxc2*, *Armxc3* y *Armc10* (Cáptiulo I, Figura 22; Cápitulo III, Figura 3). Secuencias funcionales, fueron clonadas en el vector FG12 adecuado para la obtención de lentivirus, que posee un gen reportero GFP bajo el promotor de ubiquitina. A continuación, se generaron partículas lentivirales con un alto título que fueron inyectadas en el espacio perivitelino de embriones en estadio de una célula. Posteriormente alrededor de 20 embriones fueron implantados en hembras pseudo-embarazadas de la edad adecuada. Los ratones nacidos constituirían la generación F0 de la colonia que expresarían la secuencia shRNA en la totalidad del organismo.

Los ratones F0 fueron genotipados visualmente por su expresión de GFP y por PCR en aquellos casos donde había una baja expresión. Estos ratones suelen presentar diferente número de copias insertadas en el genoma, lo que puede dar lugar a diferentes niveles de expresión de la proteína silenciada, por lo que requiere la generación de una F1 o F2 con una única copia de shRNA que silencie los niveles de proteína de manera eficiente (Lois et al., 2002) y reproducible en la descendencia.

A falta de generar una F1 estable, los ratones knock-downs para los genes *Armcx/Armc10* son viables y no presentan ninguna diferencia destacada frente a sus hermanos wild-type, lo que también había sido descrito para el ratón knock-out de *Gasp1* (Boeuf et al., 2009). Sin embargo, cuando se ha intentado reproducir estos animales, cruzando ratones machos transgénicos con hembras wild-type, estos han mostrado una baja tasa de reproducción.

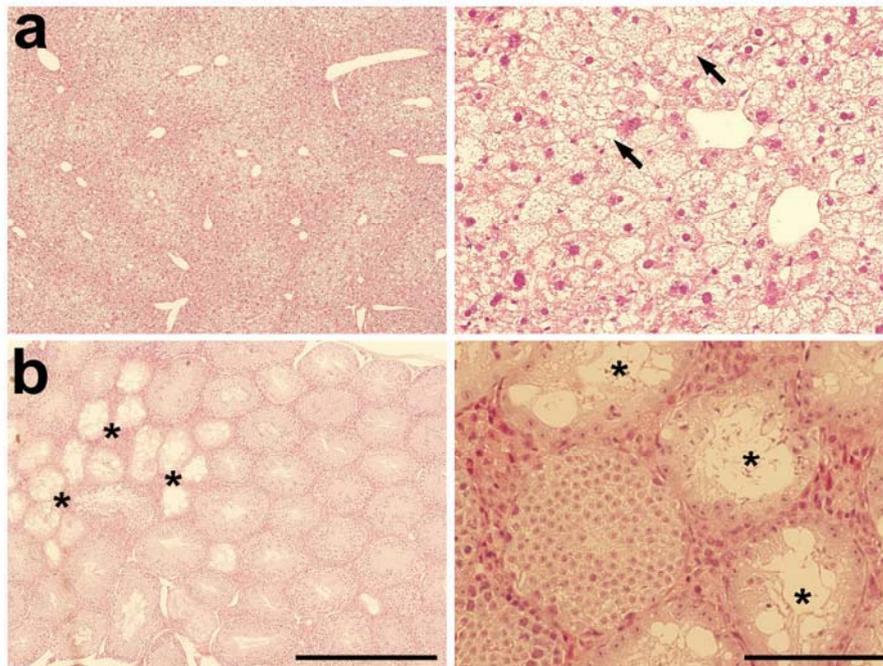


Figura 3: El hígado y testículos de los ratones knock-downs para la proteína *Armcx3*. (a) Secciones de hígado teñidas con hematoxilina-eosina muestran depósitos similares a cúmulos de lípidos (flechas). (b) Secciones de testículo mostrando atrofia de los túbulos seminíferos (asteriscos). Barra de escala: imágenes a baja magnitud (panel de la izquierda) 500 μm , imágenes a gran magnitud (panel de la derecha) 200 μm .

Para un estudio más detallado en busca de fenotipos diferenciales, técnicas de inmunohistoquímica han sido realizadas contra diferentes tejidos (testículos, hígado, piel, corazón y cerebro) en los animales knock-down *Armcx3*. Los testículos de estos animales muestran alteraciones en la formación de los espermatozoides y atrofia en los túbulos seminíferos (Figura 3), lo que posiblemente está relacionado con la baja tasa reproductiva de estos animales. En las imágenes del hígado, también se observa una organización anómala de este tejido con la presencia de estructuras semejantes a acumulaciones de lípidos y que pueden indicar alteraciones en el metabolismo hepático (Figura 3). Finalmente, cabe destacar que la apariencia de las estructuras cerebrales no presenta grandes alteraciones con respecto a sus hermanos wild-type. Ninguna diferencia destacable tampoco fue apreciable en piel o corazón.

Estudios en profundidad, también con los animales knock-downs *Armcx2* y *Armc10*, serán necesarios para confirmar estos datos preliminares. El hecho que no se hayan encontrado grandes diferencias en el fenotipo del sistema nervioso, puede deberse a una cierta redundancia en la función de las proteínas *Armcx/Armc10*, sin embargo, no es descartable que sea necesario condiciones de estrés o patológicas para observar fenotipos significativamente diferentes con los ratones wild-type, al igual que ocurre para los ratones knock-out de *Gasp1*

(Boeuf et al., 2009; Martini et al., 2010; Thompson et al., 2010). En conjunto, el estudio de estos animales supondrá una herramienta muy importante para comprender la función ‘in vivo’ de las proteínas del cluster *Armex/Armc10*.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS
PRELIMINARES

A.- La familia de proteínas Armcx

Evolución génica

El cluster de genes Armcx (Armxc1-6, Gprasp1-2 y bhlhb9) se originó por la retrotransposición de un único gen que contiene dominios armadillo (Armcl0) exclusivo de y presente en todos los vertebrados, y por subsiguientes duplicaciones en tándem de corto alcance de una región de evolución rápida en el cromosoma X de euterios. El gen Armcl0 presenta amplias similitudes en la secuencia con el resto de genes del cluster Armcx, pero destaca tanto su presencia en todos los vertebrados, a diferencia de la exclusividad de los genes Armcx en los mamíferos placentarios, como que su proteína se encuentra codificada por al menos 7 exones, frente a 1 exón para el resto de genes Armcx, lo que lo sitúa como un buen candidato para ser el ancestro de esta familia de genes.

Resulta interesante que los estudios previos sobre la evolución de esta familia de genes, destacaban la presencia de un gen ortólogo del gen Armcx6 en pez zebra (*Danio rerio*) (hypothetical protein FLJ20811, AY423030), sin embargo, recientemente esta secuencia ha sido retirada y confirmada su pertenencia a la oveja común (*Ovis aries*). El gen Armcx6 de *Danio rerio* había hecho describir el origen de esta familia al inicio de los orígenes de los vertebrados con una rápida evolución posterior en un estadio temprano de los mamíferos euterios (REF), sin embargo, el descarte de la presencia del gen Armcx6 en *Danio rerio* refuerza aun mas la noción de que el gen Armcl0 sea el ancestro del cluster Armcx y la exclusividad de este cluster de genes como una innovación de los mamíferos euterios.

Con estos datos, creemos necesaria una revisión de la nomenclatura de esta familia de genes. Previamente había sido sugerida la revisión para ser sustituida la nomenclatura por la familia de genes GASP (G protein-coupled receptor associated sorting proteins) (Abu-Helo and Simonin, 2010), aunque todavía no se ha confirmado la asociación de todas las proteínas del cluster con los receptores asociados a proteínas G, y el gen Armcl0, ancestro de la familia, también se ha incluida en ella como GASP8. Por ello, nosotros hemos creído conveniente mantener la nomenclatura oficial de los genes, especialmente en lo referente a los genes Armcx (Armadillo containing protein lost in epithelial cancers on chromosome X), nomenclatura proveniente del primer miembro identificado, Alex1 (Kurochkin et al., 2001), y que creemos mejor para nombrar a toda la familia. Esto se debe principalmente a dos razones: que todos los genes del cluster se encuentran localizados en el cromosoma X y que todos poseen dominios armadillo en su secuencia, incluidos en el dominio DUF463, y que posiblemente son un remanente de su antecesor Armcl0.

Además, debido a que: i) la expresión de las copias de los genes retrotranspuestos depende mayoritariamente de la zona de inserción; ii) los cluster de genes son normalmente mantenidos por compartir las secuencias reguladoras o una regulación a mayor escala del cluster completo; y iii) los genes pertenecientes al cluster Armcx están altamente expresados

en el tejido nervioso y están probablemente envueltos en el tráfico mitocondrial en neuronas, nosotros proponemos que el cluster de genes *Armcx* esta globalmente regulado, lo que concuerda con la similar expresión de los genes *Armcx*. Además, nosotros hipotetizamos que el desarrollo y la evolución de este cluster esta unido al incremento en la complejidad del cerebro euterio, entonces añadiendo mayor complejidad molecular a la regulación del tráfico mitocondrial, especialmente en el sistema nervioso de los vertebrados superiores.

Una familia de proteínas mitocondriales

En el presente trabajo hemos demostrado que todos los genes estudiados del cluster *Armcx* codifican para una serie de proteínas cuya localización primaria es el compartimento mitocondrial tanto en células HEK293 como en neuronas, lo cual incluye a las proteínas *Armcx1*, *Armcx2*, *Armcx3*, *Armcx5* (no mostrado), *Armcx6* y *Armc10*. Algunas de estas proteínas ya habían sido identificadas con el compartimento mitocondrial como es el caso de *Armcx3* y *Armc10* (Pagliarini et al., 2008; Mou et al., 2009), la proteína *Armcx2* y *Gprasp2* también han sido relacionadas con estructuras de membrana, que semejan una distribución mitocondrial (Smith et al., 2005; Horn et al., 2006) y la proteína *bhlhb9* recientemente ha sido descrito su interactoma en el tejido cardíaco, mostrando una proporción substancial de proteínas (aproximadamente un 27%) que se encuentran localizadas en la mitocondria (Mishra et al., 2011) lo cual refuerza una posible localización mitocondrial de esta proteína. También resulta interesante destacar que en el caso de la proteína *Gprasp2* esta fue caracterizada en las estructuras de membrana interaccionando con la Huntingtina, proteína que ha sido identificada en el compartimento mitocondrial y que regula su transporte (Horn et al., 2006; Jin and Johnson, 2010). En el caso de *GASP1* la mayoría de estudios destacan su localización citoplasmática (Matsuki et al., 2001; Kiyama et al., 2006; Martini et al., 2007), sin embargo, una posible localización mitocondrial debería ser estudiada más a fondo. Finalmente, no se han realizado estudios de localización intracelular para la proteína *Armcx4*, si bien su secuencia, similar a la de otras proteínas del cluster hace hipotetizar una posible localización mitocondrial. En conjunto estos datos parecen indicar que efectivamente las proteínas codificadas por el cluster de genes *Armcx* localizan primariamente en las mitocondrias.

La localización predominantemente mitocondrial de las proteínas *Armcx* concuerda con la secuencia nucleotídica de sus genes, que poseen una señal de localización para la membrana mitocondrial externa. Las proteínas *Armcx* poseen una secuencia transmembrana en su extremo N-terminal flanqueada por residuos aminoácidos con una alta basicidad (Capítulo I, Figura 1b). Proteínas con estas características han sido identificadas por estar localizadas en la membrana mitocondrial externa (Rapaport, 2003), lo que ha sido confirmado para la proteína *Alex3* en estudios bioquímicos y de microscopia electrónica (Mou et al.,

2009)(Capítulo I, Figura 7e,f) y cuya delección de 12 aa en N-terminal es suficiente para impedir su localización en estas organelas (Capítulo II, Figura 2). Así, podemos afirmar que las proteínas *Armcx* se encuentran localizadas en la membrana mitocondrial externa con su extremo N-terminal insertado en la membrana y su cola C-terminal (que representa la mayor parte de la proteína) mirando hacia la cara citosólica y donde probablemente tendrán lugar las interacciones con otras proteínas.

Además de las secuencias putativas de localización mitocondrial, todos los genes *Armcx/Armc10* contienen señales de localización nuclear y hasta 6 dominios similares a armadillo en la región C-terminal. Nosotros también mostramos que algunos miembros, incluyendo *Alex3* y *Armc10*, tienen una localización nuclear en neuronas, y en un estudio de dos híbridos usando *Alex3* como cebo (ver más abajo) dio lugar a la interacción con algunas proteínas nucleares implicadas en funciones nucleares (e.g., *Nap1/4*, *Nup62*; *RanBP5*, *Smarca2* o *Suds3*). La observación de que la falta de la región N-terminal conlleva a la localización nuclear de *Alex3*, y la existencia de un putativo codón de inicio en la primera metionina interna (aa 38) da la posibilidad de una isoforma alternativa de translación de *Alex3* actuando selectivamente en la mitocondria o en el núcleo. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que muestran la interacción de *Alex3* con el factor de transcripción *Sox10* y conllevan a un aumento de la actividad transcripcional por *Alex3* (Mou et al., 2009), o la regulación de la actividad transcripcional de *Armc10-B* mediante la interacción con la proteína *p53* (Zhou et al., 2007).

Finalmente, debido al control transcripcional (Zhou et al., 2007; Mou et al., 2009) y la presencia de 6 dominios similares a armadillo, los genes *Armcx/Armc10* pueden funcionalmente interactuar con la vía de *Wnt/β-catenina*. Se ha visto que *Wnts* regulan al alza la expresión de varios de estos genes, entre ellos *Armcx1*, que se encuentra regulado por *CREB* y *Wnt/β-catenina* en células de cáncer colorectal (Iseki et al., 2010), y *Armcx3*, que está regulado a la baja en las gónadas femeninas donde *Wnt4* está implicado reprimiendo genes, en contraste a gónadas masculinas o gónadas mutantes para *Wnt4* (Coveney et al., 2008). En este mismo trabajo también encuentran a *Armcx2* regulado a la baja en las gónadas femeninas frente a las masculinas, por lo que se sugiere un posible papel redundante de estos dos genes en el desarrollo de las gónadas. Además, resultados preliminares en nuestro laboratorio también han demostrado que tanto la sobreexpresión de *Armcx3* y *Armc10* producen una inhibición de la vía de *Wnt/β-catenina* en células HEK293 y médula de pollo (no mostrado).

Las proteínas *Armcx/Armc10* tienen grandes similitudes entre ellas, incluyendo una localización primaria mitocondrial, señales de localización nuclear y 6 dominios armadillo, además de presentar una alta expresión en el sistema nervioso. Esto hace pensar que pueda existir cierta redundancia en sus funciones, como ya ha sido postulado previamente (Coveney et al., 2008). Sin embargo, la aparición del cluster de 9 genes *Armcx* en los mamíferos

placentarios, hacen pensar en la aparición de una nueva adaptación fisiológica (Winter and Ponting, 2005) y mostrar un proceso finamente regulado que puede ser dependiente del estadio o tipo celular (vease por ejemplo, la diferencia en el patrón de expresión de Alex3 en el citoplasma de las células de Purkinje y en un patrón con bandas parasagitales similar al de Zebrina II (Introducción, Figura 23J) en contraste del observado para Armc10 que localiza principalmente en el núcleo de estas células (Capítulo III, Figura 2c)). En este trabajo se muestra principalmente el papel de dos de estos genes: Amcx3, miembro del cluster en el cromosoma X, y Armc10, ancestro del cluster que puede presentar características que han perdurado en los genes Armcx.

B.- Papel de Alex3 y Armc10 en la función mitocondrial

Alex3 y Armc10 regulan el transporte y dinámica mitocondrial

El tráfico y dinámica mitocondrial son especialmente importantes en neuronas donde el correcto posicionamiento de estas organelas se ha visto esencial para la viabilidad neuronal y la neurotransmisión. Datos recientes han mostrado que la dinámica mitocondrial neuronal (transporte y fusión-fisión de membranas) esta altamente coordinado y controlado por las kinesinas, las GTPasas mitofusina 1-2 y Miro1-2, y la proteína adaptadora Trak2 (Verstreken et al., 2005; Saotome et al., 2008; Misko et al., 2010). Aquí nosotros describimos una nueva familia de proteínas mitocondriales que controlan la distribución, agregación y dinámica de estas organelas y que es evolucionariamente específica de los mamíferos euterios.

La sobreexpresión de las proteínas Armcx/Armc10 se ha visto provoca la agregación y/o tethering mitocondrial tanto en neuronas como células HEK293 (Capítulo I, Figura 8, Figura 12; Capítulo III, Figura 3a), dando lugar a la formación de un clúster en la zona perinuclear. Al menos una de las proteínas, Alex3, provoca este fenotipo de agregación de forma independiente de los niveles de Miro1 (Capítulo I, Figura 17). Debido a la similitud entre las proteínas Miro1 y Miro2, existe la posibilidad que Alex3 pueda seguir produciendo la agregación mitocondrial a través del complejo KIF5/Miro2/Trak2 y que las proteínas Miro estén realizando funciones redundantes. Sin embargo, estos hallazgos también sugieren que Alex3 podría regular la agregación mitocondrial por un mecanismo todavía desconocido, que es probable que implique la interacción con otras proteínas que controlan el tethering y agregación, incluyendo mitofusinas (Santel et al., 2003) y en el que la región transmembrana de Alex3 resulta imprescindible y suficiente (Capítulo II, Figura 2d).

En neuronas, se cree que la agregación y tethering mitocondrial sirve para anclar estas organelas en localizaciones específicas que requieren una alta demanda de energía y unos requerimientos de tamponamiento de Ca^{2+} (Chang and Reynolds, 2006b; MacAskill and Kittler, 2010). El fenotipo observado por la sobreexpresión de las proteínas Armcx es similar al observado después de una disfunción de las proteínas reguladores del tráfico y la dinámica

de estas organelas, tales como Miro, Mfn, Pink1 o Trak2, lo cual sugiere que la alteración de los procesos de dinámica mitocondrial darían lugar a agregación (Huang et al., 2007; Liu and Hajnoczky, 2009; Weihofen et al., 2009; MacAskill and Kittler, 2010). Este hecho reforzaría la participación de las proteínas Armcx/Armc10 como moduladoras de alguno de estos procesos y los sitúan como componentes importantes en la maquinaria que regula la dinámica mitocondrial.

Existen numerosos trabajos que asocian la morfología mitocondrial con su funcionalidad (Rappaport et al., 1998; Brocard et al., 2003). Por esta razón, no es de extrañar que a menudo las proteínas que regulan la dinámica y el tráfico mitocondrial, tales como Mitofusinas (Santel et al., 2003) también participen en estos procesos bio-energéticos. Sin embargo, nuestros datos sugieren que la proteína Alex3 no está implicada en la respiración mitocondrial, la determinación del número de copias de mtDNA, la regulación del potencial de membrana mitocondrial o la homeostasis y manejo del Ca^{2+} en la mitocondria.

De manera similar, nosotros fuimos incapaces de encontrar evidencias de una implicación de la proteína Alex3 en la fusión mitocondrial (Capítulo I, Figura 15). Aunque Alex3 favorece la aproximación y tethering de estas organelas (Capítulo I, Figura 16) y este proceso debería facilitar la fusión mitocondrial (Hoppins and Nunnari, 2009), es posible que se requiera alguna señal para la correcta fusión de las membranas, posiblemente a través de la activación de las mitofusinas. Es por ello, que no nos es posible descartar una posible implicación de Alex3 en los procesos de fusión/fisión aunque sea de manera indirecta. Estos hallazgos, conjuntamente con las consideraciones descritas arriba, sugieren nuevamente que los genes Armcx/Armc10 constituyen una nueva familia de proteínas específicamente implicadas en la dinámica mitocondrial, regulando agregación y tráfico.

Por lo menos uno de los genes Armcx (Alex3), y el ancestro de la familia Armc10, codifican para unas proteínas que interaccionan con el complejo KIF5/Miro/Trak2, que controla la dinámica mitocondrial en neuronas de forma dependiente de Ca^{2+} (Capítulo I, Figura 25; Capítulo III, Figura 4). Nuestros experimentos de inmunoprecipitación muestran que tanto Alex3 como Armc10 interaccionan directamente con las GTPasas Miro y con el adaptador de kinesina Trak2. Sin embargo, fuimos incapaces de encontrar una interacción directa con el motor de kinesina KIF5. Esta observación no descarta la posibilidad de interacciones indirectas, particularmente a través de Trak2. Resulta importante que, la interacción de Alex3 (y posiblemente de Armc10) con las proteínas Miro/Trak2, requiere bajas concentraciones de Ca^{2+} , ya que la presencia de Ca^{2+} disminuye dramáticamente la interacción. Además, la mutación en el dominio EF-hand (sensor de calcio) de la proteína Miro1 anula esta dependencia de Ca^{2+} , indicando por lo tanto que los cambios conformacionales producidos por el Ca^{2+} en las proteínas Miro (Nelson and Chazin, 1998; MacAskill et al., 2009b; Wang and Schwarz, 2009) son mecanismos esenciales que regulan la interacción entre Alex3 y el complejo Miro/Trak2. Así, mientras que bajas concentraciones de

Ca^{2+} pueden favorecer la formación de los complejos KIF5/Miro/Trak2/Alex3, los incrementos en el Ca^{2+} intracelular rápidamente desacoplan tales complejos (incluyendo a Alex3), por lo tanto deteniendo el tráfico mitocondrial.

Nuestros experimentos indican que la región C-terminal que contiene los seis dominios armadillo es necesaria para la interacción con la proteína Miro (Capítulo I, Figura 26). Sin embargo, nosotros no podemos saber si esta interacción está mediada directamente por estos dominios, como es el caso de otras proteínas (Tewari et al., 2010), o por otras regiones de Alex3 incluidas en el C-terminal. Por otra parte, resulta interesante destacar, que ha sido descrito que los motivos similares a armadillo de la proteína p115 se unen a las GTPasa Rab1, controlando el tráfico del retículo a Golgi y regulando el tethering de las vesículas (An et al., 2009), lo cual eleva la posibilidad que los dominios armadillos de las proteínas Armcx/Armc10 estén directamente implicados en la regulación del tráfico y agregación mitocondrial.

La noción que Alex3 (y posiblemente Armc10) interacciona con el complejo Miro/Trak2 (e indirectamente con KIF5) cuando las mitocondrias son móviles a bajas concentraciones de Ca^{2+} (MacAskill et al., 2009b; Wang and Schwarz, 2009) es reforzada por nuestros hallazgos del silenciamiento de Alex3 y Armc10 endógeno en neuronas, que da lugar a una marcada disminución en los porcentajes de las mitocondrias móviles, similarmente a lo que ha sido observado en las pérdidas de función de Miro/Trak2 (Saotome et al., 2008; MacAskill et al., 2009b; Brickley and Stephenson, 2011). La observación que el silenciamiento de Alex3 y Armc10 no afectan a la velocidad de las pocas mitocondrias móviles presentes sugiere un mecanismo en las proteínas Armcx/Armc10 favorecerían la formación de los complejos KIF5/Miro/Trak2 (y por lo tanto aumentando el tráfico mitocondrial). Sin embargo, estas proteínas están improbablemente implicadas en la regulación de la actividad motora de la kinesina por ella misma. Nosotros consideramos nuestros hallazgos en la sobreexpresión de Alex3, en las que ambas, el porcentaje y la velocidad de las mitocondrias móviles fueron reducidas, proveen mayores evidencias de la implicación fisiológica de esta proteína en el tráfico mitocondrial, posiblemente al desregular o reclutando componentes del complejo (actuando como un dominante negativo). En conjunto con nuestros datos bioquímicos, los presentes estudios funcionales proponen un modelo en el que las proteínas Alex3 y Armc10 son reguladores positivos del tráfico mitocondrial, interaccionando directamente con los complejos Miro/Trak2. Además, como se muestra para el complejo KIF5/Miro/Trak2 (MacAskill et al., 2009b; Wang and Schwarz, 2009), el incremento de la actividad neuronal que conlleva a incrementos en Ca^{2+} es probablemente la causa del desensamblaje y arresto mitocondrial en los lugares de neurotransmisión activa y, por lo tanto, completando los requerimientos bioenergéticos de la transmisión neuronal.

Al igual que ocurre con otras proteínas implicadas en el transporte y morfología mitocondriales (Delettre et al., 2000; Zuchner et al., 2004), mutaciones en las proteínas

Armxcx/Armc10 podrían dar origen o contribuir a enfermedades neurodegenerativas, como CMT, AD, PD, HSP, HD,... En estas enfermedades, defectos asociados en la distribución mitocondrial en células con una regionalización tan específica de las mitocondrias como las neuronas, son una de las causas de la enfermedad (Spinazzi et al., 2008). Por ello, en colaboración con el Dr. José Ángel Berciano, del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y con el Dr. Jaume Bertranpetit, del Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universitat Pompeu Fabra, se realizaron estudios de secuenciación de la región del cromosoma X que contiene el gen Armcx3 en 5 pacientes varones diagnosticados con una variante de la enfermedad de CMT ligada al sexo. En estos ensayos se llegó a la conclusión que la secuencia génica de Armcx3 no tendría implicaciones causativas en los pacientes de CMT estudiados, sin embargo, no pudo descartarse una posible alteración de regiones reguladoras situadas a mayor distancia del gen, o la participación del gen Armcx3 en otros subgrupos en los que se clasifica esta enfermedad. Por ello, seguimos considerando importante continuar con el estudio clínico de la posible implicación de los genes Armcx/Armc10 en alguna enfermedad neurodegenerativa en la que la dinámica mitocondrial juega un papel importante y en la que las proteínas de este cluster de genes podrían desarrollar un papel importante.

En conclusión, aquí describimos una nueva familia de genes organizados en un cluster genómico y que codifica para proteínas localizadas en la mitocondria. Estas proteínas regulan la agregación, dinámica y tráfico mitocondrial en neuronas, e interaccionan con el complejo Kinesina/Miro/Trak2. Resulta importante destacar que el cluster de genes Armcx emergió rápidamente durante la evolución temprana de los Eutheria. Nosotros proponemos una mayor complejidad en los mecanismos moleculares controlando la dinámica mitocondrial, específicamente en las neuronas de los cerebros más evolucionados. Nuestros datos apuntan a funciones relevantes del cluster de genes Armcx en la función del sistema nervioso y un nuevo enlace entre la dinámica mitocondrial y la complejidad del cerebro.

Las proteínas Armcx podrían actuar como mediadores entre la mitocondria y el núcleo.

Las mitocondrias son orgánulos celulares en los que se desarrollan numerosos procesos, como la síntesis de componentes celulares, la obtención de la energía celular, la homeostasis de iones o la regulación de los procesos de apoptosis (Kroemer and Reed, 2000; Rizzuto et al., 2000), por lo que no es de extrañar que su distribución, su número y su contenido estén finamente regulados en función de los requerimientos celulares y dependientes de los diferentes momentos del desarrollo (Yaffe, 1999a; Yaffe, 1999b; Nagata, 2006). Por todo ello debe existir una comunicación constante entre el compartimento mitocondrial y el nuclear que permita a la célula responder a cambios en el estado mitocondrial, ya sean de manera fisiológica o patológica (Butow and Avadhani, 2004; Liu and

Butow, 2006; Cannino et al., 2007; Finley and Haigis, 2009).

Como ha sido descrito previamente, además de localizarse en el compartimento mitocondrial, numerosos datos apoyan una localización nuclear de las proteínas *Armcx/Armc10* en el núcleo. En este trabajo hemos demostrado como las proteínas *Alex3* y *Armc10* localizan en el núcleo de manera endógena (Capítulo I Figura 7c; Capítulo III, Figura 2b,c,d) y otros estudios ya aportan indicios para la localización nuclear de otros genes *Armcx* (Matsuki et al., 2001; Beausoleil et al., 2004; Heese et al., 2004; Kiyama et al., 2006). Esta localización dual hace suponer que este cluster de genes puede estar actuando en la comunicación entre ambos compartimentos en respuesta a determinadas condiciones y promoviendo la transcripción de genes.

Con el objetivo de profundizar en el papel que pueden realizar las proteínas *Armcx* tanto en núcleo como en otros compartimentos celulares, realizamos en el laboratorio un estudio de dos híbridos usando como cebo la proteína *Alex3* y así detectar posibles asociaciones que ayudaran a comprender la función que desarrolla *Alex3*. Corroborando los datos descritos previamente, los resultados obtenidos en este estudio de dos híbridos (Tabla 1) muestran que el 34% de las proteínas identificadas localizan principalmente en el compartimento nuclear o son proteínas relacionadas con el transporte a través de la membrana nuclear.

Estos resultados refuerzan por una parte la localización nuclear de la proteína *Alex3* y por otra pueden indicar un posible papel de *Alex3* en la regulación de la transcripción ya que diversas de las proteínas identificadas interaccionan con la maquinaria responsable de la transcripción génica. Entre ellas hay factores de transcripción como *Zfp521* y *Zfp709*, dos proteínas con dominios de Zinc aún poco caracterizados, *PARP4*, perteneciente a las *PARPs* que median la ribosilación de proteínas relacionadas con la reparación del DNA o componentes de diferentes complejos remodeladores de la cromatina como *Smarca2*, *SUDS3* o *Mi-2a*. Estos resultados también concuerdan con otros estudios que señalan la posible interacción de la proteína *Alex3* con *RPAP2*, una proteína asociada de la RNA polimerasa II (Jeronimo et al., 2007).

Entre los numerosos candidatos nucleares también se encuentran diferentes importinas y proteínas formadores del poro nuclear (*Ranbp5*, *Ranbp6* y *Nup62*) y una de ellas, *Ranbp5*, también ha sido descrita por interactuar con otro miembro de la familia *Armcx*, *bhlh9* (Heese et al., 2004). En conjunto, estos datos nos indican que la traslocación nuclear de de las proteínas *Armcx/Armc10* se daría a través de un proceso regulado.

También se han identificado algunos componentes mitocondriales que podrían permitir explicar los efectos de *Alex3* en el compartimento mitocondrial, como la proteína *Hspa9*, también conocida como mortalina y que ha sido implicada en proliferación celular, biogénesis mitocondrial, estrés oxidativo y cáncer (Kaul et al., 2002; Ma et al., 2006), o *Samm50*,

componente del complejo SAM de la membrana mitocondrial externa y que se encuentra también asociado a mitofilina, de la que se ha descrito interacción con Alex3 (Stelzl et al., 2005). Resulta interesante que también se haya descrito la interacción de mitofilina con la proteína DISC1, relacionada con la regulación del transporte mitocondrial (Park et al., 2010a) y con PINK1, relacionada con mecanismos de control de calidad mitocondrial (Weihofen et al., 2009). Smm50 y mitofilina forman un complejo llamado MIB (Mitochondrial Intermembrane space Bridging) con funciones que regulan la morfología de las crestas mitocondriales y consecuentemente la respiración mitocondrial (John et al., 2005; Ott et al., 2012) y en el que proteínas como DISC1, PINK1 y Alex3 podrían formar parte.

Debido a que no altera los parámetros bioenergéticos de la mitocondria (Capítulo I, Figura 11), Alex3 podría estar actuando en respuesta a determinadas condiciones, como alteraciones de las crestas mitocondriales, y actuar así como un shuttle, translocándose al núcleo y activando un programa transcripcional específico. Además, en respuesta a estas

Mouse-Armcx3 (30-379) vs Mouse Adult Brain				
Gene Name	GID	Nº of clones	Global PBS	Cellular component/ Transduction pathway
Actg1	48762677	2	D	Cytoskeleton
Akap6	116517310	2	D	Others
Ankrd26	124487432	6	A	Cytoskeleton
Cdc42bpa	94364568	1	D	Cytoskeleton/Wnt p.
Cltc	51491844	1	D	Others
Eml4	167234432	1	D	Cytoskeleton
Flnb	145966914	1	D	Cytoskeleton/Wnt p.
Hspa9	162461906	25	A	Mitochondria
Kalrn	94400144	1	D	Cytoskeleton
Macf1	169234939	1	D	Cytoskeleton/Wnt p.
Mtus1	111074537	3	C	Mitochondria
Nap1/4	118130698	9	A	Nucleus
Nefl	39204498	1	D	Cytoskeleton
Nup62	16716348	1	D	Nucleus
Parp4	2225543384	2	D	Nucleus
Ppp2r5c	125346019	25	A	Wnt pathway
Ranbp5	146149266	19	A	Nucleus
Ranbp6	538508663	31	A	Nucleus
Samm50	148539930	1	D	Mitochondria
Smarca2	51593083	1	D	Nucleus
Spna2	115496849	9	A	Cytoskeleton
Spred1	51036620	9	A	Others
Suds3	169881246	12	B	Nucleus
Tnip2	133892273	1	D	Others
Zfp521	146149342	1	D	Nucleus
Zfp709	1611086991	1	D	Nucleus

Mouse-Armcx3 (1-379) vs Mouse Adult Brain				
Gene Name	GID	Nº of clones	Global PBS	Cellular component/ Transduction pathway
Cand1	189409137	14	A	Others
Chd3	124358949	1	D	Nucleus
Daam1	78191776	1	D	Wnt pathway
Hspa9	162461906	1	A	Mitochondria
Magi3	118129792	1	D	Cytoskeleton
Nap1/4	118130698	1	A	Nucleus
Ppp2r5c	125346019	17	A	Others
Ranbp5	146149266	11	A	Nucleus
Ranbp6	538508663	10	A	Nucleus
Suds3	169881246	3	B	Nucleus

Tabla 1: **Posibles interactores de Alex3.** La tabla superior muestra los resultados obtenidos usando como cebo la proteína Alex3 (30-379) y la inferior con la proteína Alex3 “full-length” (1-379). Para cada uno de los genes se muestra el Gene ID (GID), el número de clones aparecidos, el Global PBS y la posible localización y participación en la vía de señalización de Wnt. El Global PBS (Protein interaction map Biological Store) es un valor que cuantifica la fiabilidad de cada interacción, desde A (alta fiabilidad) a D (confianza moderada). Esquema de colores: azul, núcleo; verde, mitocondria; naranja, citoesqueleto.

condiciones, Alex3 podría regular el transporte y tethering mitocondrial, favoreciendo así la renovación de los materiales de las mitocondrias que resultaran dañadas y actuando como un mecanismo de control de calidad (Tatsuta and Langer, 2008).

De entre las proteínas encontradas en el estudio de dos híbridos también es importante destacar la amplia presencia de componentes del citoesqueleto como filamina, espectrina, Magi2, una cadena ligera de neurofilamentos, MRCK o la proteína reguladora de cdc34. A falta de confirmar las diferentes interacciones mediante técnicas de inmunoprecipitación, en conjunto este estudio está en concordancia con la localización celular compartimentada de la proteína Alex3 y también apoyan la noción que los genes *Armcx/Armc10* actuarían como un enlace de señalización entre la mitocondria/núcleo, como ha sido mostrado para otras proteínas incluyendo Sox10, VDAC y HDAC1, (Mou et al., 2009; Galganska et al., 2010; Kim et al., 2010) o para algunas como DISC1, que también están implicadas en la regulación de la dinámica mitocondrial (Sawamura et al., 2008; Atkin et al., 2011).

C.- La vía de señalización Wnt/PKC regula los niveles de proteína de Alex3

Como hemos venido mostrando hasta ahora, las proteínas *Armcx/Armc10* configuran una familia de proteínas con una localización primariamente mitocondrial y que añaden una mayor complejidad molecular a la regulación del tráfico mitocondrial, especialmente en los sistemas nerviosos de los vertebrados superiores. Además de las secuencias putativas de localización mitocondrial, las proteínas del cluster *Armcx* contienen 6 repeticiones similares a armadillo, dispuestos en un único dominio DUF463 en la región C-terminal. En base a su enriquecimiento en los dominios similares a armadillo, nosotros proponemos que las funciones de esta familia de proteínas, y por lo tanto la dinámica mitocondrial dependiente de ellas, están reguladas por la cascada de señalización de Wnt.

La fosforilación de Alex3 por efectores downstream de Wnt regula los niveles de Alex3

Las proteínas Wnt regulan una gran diversidad de procesos, especialmente importantes durante el desarrollo del sistema nervioso, actuando a través de diferentes cascadas de señalización comúnmente clasificadas en canónicas y no-canónicas (Moon et al., 1993). Los resultados presentados en este trabajo han demostrado que la co-transfección con uno de estos morfógenos canónicos, Wnt1, conlleva a una disminución en los niveles de Alex3, que finalmente induce una reversión de la agregación mitocondrial a fenotipos similares a los controles (Capítulo II, Figura 3c, Figura 8). Un efecto similar, aunque menos marcado, también fue encontrado con la co-transfección de algunos miembros no-canónicos, como el receptor Fz2 o los miembros de Wnt Wnt5a y Wnt11.

Wnt1 fue inicialmente descrito por activar la vía canónica de señalización (McMahon

and Moon, 1989). Resulta interesante que ni la transfección con cDNA codificante para una forma constitutivamente activa β -catenin S33A o cDNA de Dvl2, o la incubación con inhibidores enzimáticos de GSK3 β (LiCl y SB216763) tuvieron efectos en los niveles de proteína de Alex3 o en la agregación mitocondrial (Capítulo II, Figura 5), de forma similar al tratamiento con otro miembro canónico de Wnt, Wnt3a, sugiriendo que los componentes típicos de la vía de Wnt/ β -catenina no son necesarios para la regulación dependiente de Wnt1 de los fenotipos mitocondriales de Alex3.

Como se ha mencionado previamente, la clasificación de los miembros de Wnt en canónicos y no-canónicos es en gran medida arbitraria y poco sostenible. Numerosos estudios demuestran que un mismo morfógeno puede activar las diferentes vías, clásicamente separadas, en función del contexto celular (Mikels and Nusse, 2006) o incluso que un mismo morfógeno lleve a cabo la activación simultánea de varias vías de señalización asociadas a proteínas Wnt (Cha et al., 2008). Por todo ello, no es de extrañar que Wnt1 este activando varias cascadas de señalización, canónica y no-canónicas, en nuestro modelo de estudio, como previamente ha sido descrito en células PC12 (Spinsanti et al., 2008), mientras que otros miembros como Wnt11, clásico ligando no-canónico (Kuhl et al., 2000b), puede estar activando otras vías que no conlleven a una fuerte reducción de los niveles de la proteína Alex3.

Además de la vía canónica de β -catenina, las proteínas de Wnt señalizan a través de diversas cascadas no-canónicas que incluyen las proteínas kinasas CKII y PKC (Kuhl et al., 2000b; Bryja et al., 2008). Nuestros resultados muestran que la vía PCP y los efectores downstream CAMKII y Calcineurina dependiente de la vía Wnt/Ca²⁺ no afectan los niveles de proteína de Alex3 o la morfología mitocondrial dependiente de Alex3. En contraste, la inhibición de CKII se ha mostrado que incrementa la degradación de Alex3 dependiente de Wnt1 y, en cambio, la activación de PKC anula el efecto dependiente de Wnt1 en los niveles de proteína de Alex3 y las dinámicas y morfología mitocondriales. Estos datos sugieren que estas 2 kinasas están envueltas en la regulación de los niveles de proteína de Alex3. Otro factor extracelular, EGF, también ha sido descrito por fosforilar Alex3 en los residuos que son putativos objetivos para CKII (Olsen et al., 2006). En conjunto, estas nociones son consistentes con la predicción de varios sitios de fosforilación para CKII y PKC en la secuencia de Alex3. Resulta interesante que al menos 5 de estos sitios de fosforilación residen entre el dominio DUF463, que contiene los 6 dominios armadillo (Capítulo II, Figura 1) y que se encuentra conservado en el resto de miembros de la familia Armcx, incluido Armc10 (Capítulo III, Figura 1).

Resulta interesante destacar que PKC, uno de los efectores de la activación de la vía de Ca²⁺, siempre ha sido descrito por ser activado por la estimulación con diferentes proteínas Wnt. Esto contrasta con los resultados obtenidos en nuestro trabajo que sugieren que la activación de la PKC sería la responsable de proteger a Alex3 y no fomentar su degradación,

lo cual sugiere que la participación de PKC en la vía de Wnt/Ca²⁺ puede ser más compleja de lo que hasta ahora se consideraba. Una de las posibilidades es que exista una participación diferencial de las diferentes isoformas de PKC. Así, diferentes isoformas serían activadas o inhibidas en respuesta a una misma señal extracelular. Otra de las posibilidades que sería necesario estudiar, es la regulación de la localización de PKC en respuesta a las proteínas Wnt. La proteína kinasa C se localiza en una gran diversidad de compartimentos celulares, incluidos el núcleo y las mitocondrias, y la regulación de su localización se ha visto fundamental para poder fosforilar a su sustrato (Mochly-Rosen and Gordon, 1998; Lau et al., 2012). La estimulación por Wnts ha sido descrita por translocar la PKC hacia la membrana plasmática (Kinoshita et al., 2003), haciendo diana en los sustratos moleculares en la membrana pero que a su vez podría suponer el alejamiento de otros sustratos, como por ejemplo la proteína Alex3 que localiza principalmente en las mitocondrias, de forma que la activación de PKC dependiente de Wnts podría suponer una inhibición efectiva de la fosforilación de Alex3 por PKC y una consecuente degradación.

El papel que desarrolla PKC en la vía no-canónica de Wnt no esta claro. Sin embargo, diversos estudios han mostrado la participación de esta vía en la regulación de procesos tales como la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Yu et al., 2006; Liang et al., 2007; Spinsanti et al., 2008; Koyanagi et al., 2009; Santos et al., 2010a). Algunas isoenzimas de PKC, tales como la PKC δ , han sido relacionadas con procesos específicos tales como los movimientos de extensión convergente durante la gastrulación embrionica (Kinoshita et al., 2003), y las PKCs atípicas han sido implicadas en la polarización neuronal (Zhang et al., 2007). Finalmente, la PKC regulada por Wnt también ha sido enlazada al progreso de cánceres, donde puede mediar la motilidad celular, invasión y metástasis dependientes de Wnt (Dissanayake et al., 2007; Medrano, 2007; Lee et al., 2010; Luna-Ulloa et al., 2011). Dado que la proteína Alex3 fue inicialmente descrita como un putativo factor supresor de tumores y esta perdida en diversos carcinomas epiteliales (Kurochkin et al., 2001), y que la vía de Wnt/ β -catenina juega un rol importante en la iniciación del cáncer y el crecimiento tumoral (Morin et al., 1997; Smalley and Dale, 1999), futuros análisis serán requeridos para desvelar la contribución exacta de Alex3 en estos procesos patológicos y la regulación de esta proteína por la vía de Wnt.

Menos aun se sabe acerca del papel de CKII en la vía de Wnt. La proteína CKII es una kinasa constitutivamente activa que se ha visto es up-regulada tras una estimulación por factores Wnt y conlleva principalmente a la potenciación de la vía canónica a través de la fosforilación de diferentes sustratos, como Dvl o beta-catenina (Song et al., 2000; Gao and Wang, 2006; Dominguez et al., 2009). CKII también se ha descrito por jugar un importante papel en algunas vías no-canónicas (Bryja et al., 2008) y es un efector downstream de diferentes cascadas de señalización como EGF que, a través de la regulación de CKII, pueden actuar sobre las vías asociadas a Wnt (Ji et al., 2009). Nuestros resultados muestran que la

inhibición de CKII contribuye a la degradación de Alex3 y que esta kinasa podría regular los niveles de Alex3 a través de los morfógenos Wnt. CKII, como PKC, se encuentra en la practica totalidad de los compartimentos celulares, y su distribución y actividad en cada uno de ellos esta altamente regulada (Faust and Montenarh, 2000; Litchfield, 2003), lo cual puede suponer que las diferentes proteínas Wnt regulan diferencialmente la actividad de CKII a través de cambios en su localización, sin embargo, futuros estudios serán necesarios para confirmar estos resultados.

Los resultados obtenidos muestran que la proteína Alex3 presenta una degradación diferencial. Mientras su vida media en condiciones normales es regulada a través del proteosoma, la degradación inducida por Wnt es independiente de este sistema (Capítulo II, Figura 6a,b). Esto permitiría a la célula actuar sobre su vida media de manera diferencial en base a diferentes situaciones fisiológicas y de esta manera regular aspectos de la dinámica mitocondrial. No podemos descartar otros sistemas de degradación de la proteína Alex3, a través de un procesamiento proteolítico, que alterara su función mitocondrial y llevará asociado una perdida de inmunodetección, o a través de la vía de degradación lisosomal mostrando, en este caso, una cierta semejanza con el miembro de la cascada de señalización de Wnt Dishevelled, el cual ve regulado sus niveles a través de esta vía mediante un feedback negativo que conlleva su fosforilación por la PKC (Jung et al., 2009).

La fosforilación de residuos de Serina/Treonina en Alex3 juega un papel importante en la regulación de los niveles de esta proteína. Uno de los genes encontrados en el estudio de dos híbridos, Ppp2r5c, con una alta fidelidad y para el que se han encontrado más clones (32) (Tabla 1), codifica para la subunidad reguladora B56 γ de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y que puede indicar una nueva forma de regulación para las proteínas Armcx/Armc10. Otras proteínas del cluster ya han sido relacionadas con esta fosfatasa, bhlhb9 interacciona con la PP2A (Heese et al., 2004) y tanto Armcx2 y la subunidad B56 γ se encuentran up-regulados en pacientes del síndrome X-frágil actuando como supresores de tumores por lo que podrían actuar en una misma vía de señalización (Rosales-Reynoso et al., 2010). La PP2A, y las subunidades B56, también son reguladas a través de las proteínas Wnt (Ratcliffe et al., 2000; Li et al., 2001; Yokoyama and Malbon, 2007) por lo que esta fosfatasa también podría contribuir a regular los niveles de las proteínas Armcx/Armc10. En conclusión, estos datos apuntan a que la participación de kinasas como PKC y CKII y posiblemente fosfatasas como PP2A, a través de cascadas de señalización extracelulares, como las asociadas a las proteínas Wnt, suponen un importante mecanismo de regulación para las proteínas Armcx/Armc10.

La degradación de Alex3 por Wnts como mecanismo regulador de la dinámica mitocondrial

Los datos presentados en este trabajo muestran que la sobreexpresión de Alex3

conlleva a la agregación y/o tethering mitocondrial y a una disminución de la dinámica y tráfico mitocondrial. Aunque el papel exacto de la agregación mitocondrial no está claro, es creído que puede servir para capturar estas organelas a lugares específicos que requieren un alto consumo de energía y/o condiciones de tamponamiento de Ca^{2+} altas (Chang and Reynolds, 2006b; MacAskill and Kittler, 2010). Los fenotipos de agregación mitocondrial han sido observados después de la disfunción de las proteínas Miro y Trak2, que regulan el tráfico mitocondrial, lo que sugiere que la alteración de las proteínas que regulan el transporte y tráfico mitocondrial puede ser uno de los mecanismos que finalizan en agregación (Liu and Hajnoczky, 2009; MacAskill and Kittler, 2010).

Nuestros datos indican que los fenotipos de agregación mitocondrial inducidos por Alex3 fueron revertidos después del tratamiento con Wnt1, y en menor medida por otros miembros de la vía de Wnt como Fz2, Wnt5a o Wnt11, que conllevan a una disminución de los niveles de Alex3 y correspondiente vuelta a una morfología y dinámicas similares a los fenotipos control (Capítulo II, Figura 3). Recientes estudios han sugerido diversos enlaces moleculares entre las vías de Wnt y la función mitocondrial. Por ejemplo, Wnts han sido propuestos por promover la biogénesis mitocondrial (An et al., 2010; Yoon et al., 2010), incrementar la producción de ROS (Yoon et al., 2010) y mediar la apoptosis regulada por las mitocondrias (Deng et al., 2009; Wang et al., 2009c). Además, diversos efectores downstream de Wnt que regulan e interaccionan con los complejos Blc2/Blc-xL se unen a mitocondrias (Wang et al., 2009c) y por ejemplo, la β -catenina asociada a mitocondrias ha sido descrita por estar relacionada con la respuesta al leukotrieno D4, incrementando la actividad de la NADPH deshidrogenasa y el ratio ATP/ADP, así como regulando la expresión de genes mitocondriales (Mezhybovska et al., 2009). Finalmente, el APC mitocondrial ha sido asociado con la supervivencia de tumores por reclutar Bcl2 (Brocardo et al., 2008).

Las proteínas Wnt han sido involucradas en multitud de procesos del desarrollo de varios tejidos entre los que destaca el SN. Entre sus acciones van desde el control de la proliferación, diferenciación, migración celular, guía axonal o la formación de sinapsis (Salinas, 1999; Chenn and Walsh, 2002; Lyuksyutova et al., 2003; Hirabayashi et al., 2004; Carmona-Fontaine et al., 2008; Matthews et al., 2008; Salinas and Zou, 2008), procesos que son extremadamente costosos a nivel energético. Las mitocondrias se distribuyen heterogéneamente en el espacio intracelular para compensar estos requerimientos locales de energía o la necesidad de tamponamiento de elevadas cantidades de Ca^{2+} (Morris and Hollenbeck, 1993; Hollenbeck and Saxton, 2005). Se conoce poco acerca de las vías de señalización implicadas en la regulación de estos procesos. Factores como NGF, Serotonina, Dopamina o la activación de la cascada de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA han sido descritos por su regulación de la dinámica mitocondrial (Rintoul et al., 2003; Chada and Hollenbeck, 2004; Chen et al., 2007b; Chen et al., 2008). No ha sido hasta recientemente cuando se han propuesto los modelos que regularían el transporte mitocondrial a través de la

regulación de los niveles de Ca^{2+} y en los que el componente principal lo constituiría el complejo regulador del transporte mitocondrial KIF5/Miro/Trak2 (MacAskill et al., 2009b; Wang and Schwarz, 2009) y del que Alex3 forma parte (Capítulo I, Figura 25).

En conjunto, estos datos apoyarían la noción que las proteínas Wnt desencadenarían transientes de Ca^{2+} intracelular que puedan afectar de manera local a la activación o inhibición de determinadas kinasas u otros efectores como las proteínas Miro1/2, modulando así los niveles de proteínas como Alex3, actuando así sobre la regulación de la dinámica mitocondrial durante procesos de migración, guía axonal o sinaptogénesis en los que los ligandos Wnt están implicados. A falta de desarrollar un modelo fisiológico en el que comprobar la participación de Alex3 en respuesta a los morfógenos Wnt, nuestros datos soportan la noción que las cascadas de señalización de Wnt regulan varias y convergentes funciones de la biología mitocondrial, incluyendo la regulación de la agregación, dinámica y tráfico mitocondrial.

CONCLUSIONES

- 1.- Los genes *Armex* se originaron a partir de la retrotransposición del gen *Armc10* en el cromosoma X y rápida duplicación in tándem en una evolución temprana de los mamíferos euterios. Estos genes presentan una alta expresión en el sistema nervioso central, lo que sugiere que el cluster de genes *Armex* está globalmente regulado.**
- 2.- Las proteínas *Armex3* y *Armc10* poseen primariamente una localización bimodal, encontrándose asociadas a la membrana externa mitocondrial y en el núcleo celular. Esta localización concuerda con las secuencias proteicas que poseen putativos dominios de localización en estos compartimentos.**
- 3. – La sobreexpresión de las proteínas *Armex/Armc10* producen una profunda alteración de la red mitocondrial que resulta en un agregado en la zona perinuclear. Al menos una de estas proteínas, *Alex3*, presenta este fenotipo de forma independiente de *Miro1*.**
- 4.- Los niveles de la proteína *Alex3* no inducen cambios en los parámetros bioenergéticos mitocondriales, tales como el consumo de oxígeno, el potencial de membrana, el contenido de DNA mitocondrial, la actividad de la citocromo c oxidasa o la recaptación de Ca^{2+} . De manera similar, los niveles de *Alex3* no alteran el balance de fisión/fusión mitocondrial.**
- 5.- La sobreexpresión y el silenciamiento de las proteínas *Alex3* y *Armc10* en neuronas hipocampales alteran la distribución y transporte mitocondrial.**
- 6.- Las proteínas *Alex3* y *Armc10* interaccionan con el complejo Kinesina/*Miro/Trak2*, regulador del transporte mitocondrial. Al menos la interacción de *Alex3* con el complejo es dependiente de los niveles de Ca^{2+} , produciéndose el desensamblaje del mismo cuando los niveles de Ca^{2+} son elevados.**
- 7.- La vía de señalización asociada a proteínas Wnt induce la degradación de la proteína *Alex3*. Dicha degradación se da por un proceso independiente del proteosoma.**
- 8.- La degradación de *Alex3* por las vías de señalización asociadas a Wnt no depende de los componentes de la vía canónica Dishevelled, *GSK3-β* y β -catenina ni de los**

componentes no canónicos JNK, CAMKII y calcineurina.

9.- La PKC y la CK2 juegan un papel principal en el control y degradación de los niveles de la proteína Alex3 de forma dependiente e independiente de las vías de señalización de Wnt. La depleción de los niveles intracelulares de Ca^{2+} también reproduce la degradación de Alex3.

10.- La degradación de Alex3 a través de las vías de señalización asociadas a las proteínas Wnt revierte los fenotipos de agregación mitocondrial inducidos por la sobreexpresión de Alex3 y es evitado por la activación de la PKC.

BIBLIOGRAFÍA

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R.: beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 16 (1997) 3797-804.
- Abu-Helo, A. and Simonin, F.: Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs). *Pharmacol Ther* 126 (2010) 244-50.
- Adler, P.N., Vinson, C., Park, W.J., Conover, S. and Klein, L.: Molecular structure of frizzled, a *Drosophila* tissue polarity gene. *Genetics* 126 (1990) 401-16.
- Ahmad-Annur, A., Ciani, L., Simeonidis, I., Herreros, J., Fredj, N.B., Rosso, S.B., Hall, A., Brickley, S. and Salinas, P.C.: Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J Cell Biol* 174 (2006) 127-39.
- Ahumada, A., Slusarski, D.C., Liu, X., Moon, R.T., Malbon, C.C. and Wang, H.Y.: Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP. *Science* 298 (2002) 2006-10.
- Akiyama, T.: Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 11 (2000) 273-82.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. and Wissinger, B.: OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26 (2000) 211-5.
- Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S. and Marti, E.: Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development* 135 (2008) 237-47.
- Amati-Bonneau, P., Valentino, M.L., Reynier, P., Gallardo, M.E., Bornstein, B., Boissiere, A., Campos, Y., Rivera, H., de la Aleja, J.G., Carroccia, R., Iommarini, L., Labauge, P., Figarella-Branger, D., Marcorelles, P., Furby, A., Beauvais, K., Letournel, F., Liguori, R., La Morgia, C., Montagna, P., Liguori, M., Zanna, C., Rugolo, M., Cossarizza, A., Wissinger, B., Verny, C., Schwarzenbacher, R., Martin, M.A., Arenas, J., Ayuso, C., Garesse, R., Lenaers, G., Bonneau, D. and Carelli, V.: OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 131 (2008) 338-51.
- An, J.H., Yang, J.Y., Ahn, B.Y., Cho, S.W., Jung, J.Y., Cho, H.Y., Cho, Y.M., Kim, S.W., Park, K.S., Kim, S.Y., Lee, H.K. and Shin, C.S.: Enhanced mitochondrial biogenesis contributes to Wnt induced osteoblastic differentiation of C3H10T1/2 cells. *Bone* 47 (2010) 140-50.
- An, Y., Chen, C.Y., Moyer, B., Rotkiewicz, P., Elsliger, M.A., Godzik, A., Wilson, I.A. and Balch, W.E.: Structural and functional analysis of the globular head domain of p115 provides insight into membrane tethering. *J Mol Biol* 391 (2009) 26-41.
- Andreu, A.L., Martinez, R., Marti, R. and Garcia-Arumi, E.: Quantification of mitochondrial DNA copy number: pre-analytical factors. *Mitochondrion* 9 (2009) 242-6.
- Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M.A. and et al.: The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4 (1993) 398-403.
- Angevine, J.B., Jr. and Sidman, R.L.: Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192 (1961) 766-8.
- Ataman, B., Ashley, J., Gorczyca, M., Ramachandran, P., Fouquet, W., Sigrist, S.J. and Budnik, V.: Rapid activity-dependent modifications in synaptic structure and function require bidirectional Wnt signaling. *Neuron* 57 (2008) 705-18.
- Atkin, T.A., MacAskill, A.F., Brandon, N.J. and Kittler, J.T.: Disrupted in Schizophrenia-1 regulates intracellular trafficking of mitochondria in neurons. *Mol Psychiatry* 16 (2011) 122-4, 121.

- Atorino, L., Silvestri, L., Koppen, M., Cassina, L., Ballabio, A., Marconi, R., Langer, T. and Casari, G.: Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 163 (2003) 777-87.
- Augustine, K., Liu, E.T. and Sadler, T.W.: Antisense attenuation of Wnt-1 and Wnt-3a expression in whole embryo culture reveals roles for these genes in craniofacial, spinal cord, and cardiac morphogenesis. *Dev Genet* 14 (1993) 500-20.
- Avila, M.E., Sepulveda, F.J., Burgos, C.F., Moraga-Cid, G., Parodi, J., Moon, R.T., Aguayo, L.G., Opazo, C. and De Ferrari, G.V.: Canonical Wnt3a modulates intracellular calcium and enhances excitatory neurotransmission in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 285 (2010) 18939-47.
- Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman, J.M., Moon, R.T. and Perrimon, N.: Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* 12 (1998) 2610-22.
- Baloh, R.H., Schmidt, R.E., Pestronk, A. and Milbrandt, J.: Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 27 (2007) 422-30.
- Baloyannis, S.J.: Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9 (2006) 119-26.
- Banchs, I., Casasnovas, C., Montero, J., Martinez-Matos, J.A. and Volpini, V.: Two Spanish families with Charcot-Marie-Tooth type 2A: clinical, electrophysiological and molecular findings. *Neuromuscul Disord* 18 (2008) 974-8.
- Barsoum, M.J., Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Kushnareva, Y., Graber, S., Kovacs, I., Lee, W.D., Waggoner, J., Cui, J., White, A.D., Bossy, B., Martinou, J.C., Youle, R.J., Lipton, S.A., Ellisman, M.H., Perkins, G.A. and Bossy-Wetzel, E.: Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *Embo J* 25 (2006) 3900-11.
- Barth, A.I., Caro-Gonzalez, H.Y. and Nelson, W.J.: Role of adenomatous polyposis coli (APC) and microtubules in directional cell migration and neuronal polarization. *Semin Cell Dev Biol* 19 (2008) 245-51.
- Bartlett, S.E., Enquist, J., Hopf, F.W., Lee, J.H., Gladher, F., Kharazia, V., Waldhoer, M., Mailliard, W.S., Armstrong, R., Bonci, A. and Whistler, J.L.: Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 11521-6.
- Bastock, R., Strutt, H. and Strutt, D.: Strabismus is asymmetrically localised and binds to Prickle and Dishevelled during Drosophila planar polarity patterning. *Development* 130 (2003) 3007-14.
- Batlevi, Y. and La Spada, A.R.: Mitochondrial autophagy in neural function, neurodegenerative disease, neuron cell death, and aging. *Neurobiol Dis* 43 (2010) 46-51.
- Beal, M.F.: Oxidative damage as an early marker of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 26 (2005) 585-6.
- Beaumont, V., Thompson, S.A., Choudhry, F., Nuthall, H., Glantschnig, H., Lipfert, L., David, G.R., Swain, C.J., McAllister, G. and Munoz-Sanjuan, I.: Evidence for an enhancement of excitatory transmission in adult CNS by Wnt signaling pathway modulation. *Mol Cell Neurosci* 35 (2007) 513-24.
- Beausoleil, S.A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J.E., Villen, J., Li, J., Cohn, M.A., Cantley, L.C. and Gygi, S.P.: Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 12130-5.
- Bejsovec, A.: Wnt pathway activation: new relations and locations. *Cell* 120 (2005) 11-4.

- Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R.W. and Turnbull, D.M.: High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 38 (2006) 515-7.
- Bereiter-Hahn, J. and Voth, M.: Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27 (1994) 198-219.
- Bers, D.M., Patton, C.W. and Nuccitelli, R.: A practical guide to the preparation of Ca²⁺ buffers. *Methods Cell Biol* 40 (1994) 3-29.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J. and Nusse, R.: A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382 (1996) 225-30.
- Biernat, J., Wu, Y.Z., Timm, T., Zheng-Fischhofer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L. and Mandelkow, E.M.: Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell* 13 (2002) 4013-28.
- Bilic, J., Huang, Y.L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.M., Bienz, M. and Niehrs, C.: Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316 (2007) 1619-22.
- Billiard, J., Way, D.S., Seestaller-Wehr, L.M., Moran, R.A., Mangine, A. and Bodine, P.V.: The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt signaling in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 19 (2005) 90-101.
- Blanc, E., Roux, G.L., Benard, J. and Raguenez, G.: Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. *Oncogene* 24 (2005) 1277-83.
- Blasius, T.L., Cai, D., Jih, G.T., Toret, C.P. and Verhey, K.J.: Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *J Cell Biol* 176 (2007) 11-7.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. and Shaw, J.M.: The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* 1 (1999) 298-304.
- Boeuf, J., Trigo, J.M., Moreau, P.H., Lecourtier, L., Vogel, E., Cassel, J.C., Mathis, C., Klosien, P., Maldonado, R. and Simonin, F.: Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP-1-deficient mice. *Eur J Neurosci* 30 (2009) 860-8.
- Boldogh, I.R. and Pon, L.A.: Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol* 17 (2007) 502-10.
- Bonvini, P., An, W.G., Rosolen, A., Nguyen, P., Trepel, J., Garcia de Herreros, A., Dunach, M. and Neckers, L.M.: Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant beta-catenin in melanoma cells, increases beta-catenin-E-cadherin association, and decreases beta-catenin-sensitive transcription. *Cancer Res* 61 (2001) 1671-7.
- Bossy-Wetzel, E., Barsoum, M.J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R. and Lipton, S.A.: Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 15 (2003) 706-16.
- Bossy-Wetzel, E., Petrilli, A. and Knott, A.B.: Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 31 (2008) 609-16.
- Boutros, M., Mihaly, J., Bouwmeester, T. and Mlodzik, M.: Signaling specificity by Frizzled receptors in *Drosophila*. *Science* 288 (2000) 1825-8.
- Boutros, M. and Mlodzik, M.: Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech Dev* 83 (1999) 27-37.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I. and Mlodzik, M.: Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94 (1998) 109-18.
- Bovolenta, P., Rodriguez, J. and Esteve, P.: Frizzled/RYK mediated signalling in axon

- guidance. *Development* 133 (2006) 4399-408.
- Bowes, T. and Gupta, R.S.: Novel mitochondrial extensions provide evidence for a link between microtubule-directed movement and mitochondrial fission. *Biochem Biophys Res Commun* 376 (2008) 40-5.
- Braschi, E., Zunino, R. and McBride, H.M.: MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep* 10 (2009) 748-54.
- Brickley, K., Pozo, K. and Stephenson, F.A.: N-acetylglucosamine transferase is an integral component of a kinesin-directed mitochondrial trafficking complex. *Biochim Biophys Acta* 1813 (2011) 269-81.
- Brickley, K., Smith, M.J., Beck, M. and Stephenson, F.A.: GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. *J Biol Chem* 280 (2005) 14723-32.
- Brickley, K. and Stephenson, F.A.: Trafficking kinesin protein (TRAK)-mediated transport of mitochondria in axons of hippocampal neurons. *J Biol Chem* 286 (2011) 18079-92.
- Bridgman, P.C.: Myosin-dependent transport in neurons. *J Neurobiol* 58 (2004) 164-74.
- Brocard, J.B., Rintoul, G.L. and Reynolds, I.J.: New perspectives on mitochondrial morphology in cell function. *Biol Cell* 95 (2003) 239-42.
- Brocardo, M., Lei, Y., Tighe, A., Taylor, S.S., Mok, M.T. and Henderson, B.R.: Mitochondrial targeting of adenomatous polyposis coli protein is stimulated by truncating cancer mutations: regulation of Bcl-2 and implications for cell survival. *J Biol Chem* 283 (2008) 5950-9.
- Brockmann, K., Dreha-Kulaczewski, S., Dechent, P., Bonnemann, C., Helms, G., Kyllerman, M., Bruck, W., Frahm, J., Huehne, K., Gartner, J. and Rautenstrauss, B.: Cerebral involvement in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mitofusin2 mutations. *J Neurol* 255 (2008) 1049-58.
- Brooks, C. and Dong, Z.: Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak? *Cell Cycle* 6 (2007) 3043-7.
- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z.J. and Dong, Z.: Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 11649-54.
- Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L. and Basler, K.: pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wntless signal in *Drosophila*. *Nature* 385 (1997) 829-33.
- Bryja, V., Andersson, E.R., Schambony, A., Esner, M., Bryjova, L., Biris, K.K., Hall, A.C., Kraft, B., Cajanek, L., Yamaguchi, T.P., Buckingham, M. and Arenas, E.: The extracellular domain of Lrp5/6 inhibits noncanonical Wnt signaling in vivo. *Mol Biol Cell* 20 (2009) 924-36.
- Bryja, V., Schambony, A., Cajanek, L., Dominguez, I., Arenas, E. and Schulte, G.: Beta-arrestin and casein kinase 1/2 define distinct branches of non-canonical WNT signalling pathways. *EMBO Rep* 9 (2008) 1244-50.
- Bryja, V., Schulte, G., Rawal, N., Grahn, A. and Arenas, E.: Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. *J Cell Sci* 120 (2007) 586-95.
- Budnik, V. and Salinas, P.C.: Wnt signaling during synaptic development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21 (2011) 151-9.
- Bueler, H.: Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 218 (2009) 235-46.
- Burden, S.J.: Wnts as retrograde signals for axon and growth cone differentiation. *Cell* 100 (2000) 495-7.
- Burgess, A.W., Faux, M.C., Layton, M.J. and Ramsay, R.G.: Wnt signaling and colon

- tumorigenesis--a view from the periphery. *Exp Cell Res* 317 (2011) 2748-58.
- Butow, R.A. and Avadhani, N.G.: Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14 (2004) 1-15.
- Cai, Q., Davis, M.L. and Sheng, Z.H.: Regulation of axonal mitochondrial transport and its impact on synaptic transmission. *Neurosci Res* (2011).
- Cai, Q., Gerwin, C. and Sheng, Z.H.: Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. *J Cell Biol* 170 (2005) 959-69.
- Cai, Q. and Sheng, Z.H.: Mitochondrial transport and docking in axons. *Exp Neurol* 218 (2009a) 257-67.
- Cai, Q. and Sheng, Z.H.: Moving or stopping mitochondria: Miro as a traffic cop by sensing calcium. *Neuron* 61 (2009b) 493-6.
- Cai, Y., Singh, B.B., Aslanukov, A., Zhao, H. and Ferreira, P.A.: The docking of kinesins, KIF5B and KIF5C, to Ran-binding protein 2 (RanBP2) is mediated via a novel RanBP2 domain. *J Biol Chem* 276 (2001) 41594-602.
- Cannino, G., Di Liegro, C.M. and Rinaldi, A.M.: Nuclear-mitochondrial interaction. *Mitochondrion* 7 (2007) 359-66.
- Caricasole, A., Bakker, A., Copani, A., Nicoletti, F., Gaviraghi, G. and Terstappen, G.C.: Two sides of the same coin: Wnt signaling in neurodegeneration and neuro-oncology. *Biosci Rep* 25 (2005) 309-27.
- Carmona-Fontaine, C., Matthews, H. and Mayor, R.: Directional cell migration in vivo: Wnt at the crest. *Cell Adh Migr* 2 (2008) 240-2.
- Casasnovas, C., Cano, L.M., Alberti, A., Cespedes, M. and Rigo, G.: Charcot-Marie-tooth disease. *Foot Ankle Spec* 1 (2008) 350-4.
- Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M. and Bejsovec, A.: Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395 (1998) 604-8.
- Caviness, V.S., Jr. and Takahashi, T.: Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev* 17 (1995) 159-63.
- Cereghetti, G.M., Costa, V. and Scorrano, L.: Inhibition of Drp1-dependent mitochondrial fragmentation and apoptosis by a polypeptide antagonist of calcineurin. *Cell Death Differ* 17 (2010) 1785-94.
- Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Martins de Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P. and Scorrano, L.: Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 15803-8.
- Cerpa, W., Gambrell, A., Inestrosa, N.C. and Barria, A.: Regulation of NMDA-receptor synaptic transmission by Wnt signaling. *J Neurosci* 31 (2011) 9466-71.
- Cerpa, W., Godoy, J.A., Alfaro, I., Farias, G.G., Metcalfe, M.J., Fuentealba, R., Bonansco, C. and Inestrosa, N.C.: Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 283 (2008) 5918-27.
- Cervený, K.L., Tamura, Y., Zhang, Z., Jensen, R.E. and Sesaki, H.: Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol* 17 (2007) 563-9.
- Ciani, L., Boyle, K.A., Dickins, E., Sahores, M., Anane, D., Lopes, D.M., Gibb, A.J. and Salinas, P.C.: Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011) 10732-7.
- Ciani, L., Krylova, O., Smalley, M.J., Dale, T.C. and Salinas, P.C.: A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: dishevelled signals locally to stabilize microtubules. *J Cell Biol* 164 (2004) 243-53.
- Ciani, L. and Salinas, P.C.: WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* 6 (2005) 351-62.

- Ciani, L. and Salinas, P.C.: c-Jun N-terminal kinase (JNK) cooperates with Gsk3beta to regulate Dishevelled-mediated microtubule stability. *BMC Cell Biol* 8 (2007) 27.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B. and Scorrano, L.: OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 15927-32.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L. and De Strooper, B.: Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126 (2006) 163-75.
- Clevers, H.: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127 (2006) 469-80.
- Cohen, M.M., Amiot, E.A., Day, A.R., Leboucher, G.P., Pryce, E.N., Glickman, M.H., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. and Weissman, A.M.: Sequential requirements for the GTPase domain of the mitofusin Fzo1 and the ubiquitin ligase SCFMdm30 in mitochondrial outer membrane fusion. *J Cell Sci* 124 (2011) 1403-10.
- Cohen, M.M., Leboucher, G.P., Livnat-Levanon, N., Glickman, M.H. and Weissman, A.M.: Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell* 19 (2008) 2457-64.
- Costa, V., Giacomello, M., Hudec, R., Lopreiato, R., Ermak, G., Lim, D., Malorni, W., Davies, K.J., Carafoli, E. and Scorrano, L.: Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli. *EMBO Mol Med* 2 (2010) 490-503.
- Coveney, D., Ross, A.J., Slone, J.D. and Capel, B.: A microarray analysis of the XX Wnt4 mutant gonad targeted at the identification of genes involved in testis vascular differentiation. *Gene Expr Patterns* 8 (2008) 529-37.
- Cribbs, J.T. and Strack, S.: Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 8 (2007) 939-44.
- Crimella, C., Baschiroto, C., Arnoldi, A., Tonelli, A., Tenderini, E., Airoidi, G., Martinuzzi, A., Trabacca, A., Losito, L., Scarlato, M., Benedetti, S., Scarpini, E., Spinicci, G., Bresolin, N. and Bassi, M.: Mutations in the motor and stalk domains of KIF5A in spastic paraplegia type 10 and in axonal Charcot-Marie-Tooth type 2. *Clin Genet* (2011).
- Cruz, J.C. and Tsai, L.H.: Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 10 (2004) 452-8.
- Cui, M., Tang, X., Christian, W.V., Yoon, Y. and Tieu, K.: Perturbations in mitochondrial dynamics induced by human mutant PINK1 can be rescued by the mitochondrial division inhibitor mdivi-1. *J Biol Chem* 285 (2010) 11740-52.
- Cuitino, L., Godoy, J.A., Farias, G.G., Couve, A., Bonansco, C., Fuenzalida, M. and Inestrosa, N.C.: Wnt-5a modulates recycling of functional GABAA receptors on hippocampal neurons. *J Neurosci* 30 (2010) 8411-20.
- Cha, S.W., Tadjuidje, E., Tao, Q., Wylie, C. and Heasman, J.: Wnt5a and Wnt11 interact in a maternal Dkk1-regulated fashion to activate both canonical and non-canonical signaling in *Xenopus* axis formation. *Development* 135 (2008) 3719-29.
- Chada, S.R. and Hollenbeck, P.J.: Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling. *J Exp Biol* 206 (2003) 1985-92.
- Chada, S.R. and Hollenbeck, P.J.: Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr Biol* 14 (2004) 1272-6.
- Chan, D.C.: Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125 (2006a) 1241-52.
- Chan, D.C.: Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22

- (2006b) 79-99.
- Chan, N.C., Salazar, A.M., Pham, A.H., Sweredoski, M.J., Kolawa, N.J., Graham, R.L., Hess, S. and Chan, D.C.: Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* 20 (2011) 1726-37.
- Chang, C.R. and Blackstone, C.: Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282 (2007) 21583-7.
- Chang, C.R., Manlandro, C.M., Arnoult, D., Stadler, J., Posey, A.E., Hill, R.B. and Blackstone, C.: A lethal de novo mutation in the middle domain of the dynamin-related GTPase Drp1 impairs higher order assembly and mitochondrial division. *J Biol Chem* 285 (2011) 32494-503.
- Chang, D.T., Honick, A.S. and Reynolds, I.J.: Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *J Neurosci* 26 (2006a) 7035-45.
- Chang, D.T. and Reynolds, I.J.: Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture. *Neuroscience* 141 (2006a) 727-36.
- Chang, D.T. and Reynolds, I.J.: Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons. *Prog Neurobiol* 80 (2006b) 241-68.
- Chang, D.T., Rintoul, G.L., Pandipati, S. and Reynolds, I.J.: Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. *Neurobiol Dis* 22 (2006b) 388-400.
- Chen, A.E., Ginty, D.D. and Fan, C.M.: Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature* 433 (2005a) 317-22.
- Chen, H. and Chan, D.C.: Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr Top Dev Biol* 59 (2004) 119-44.
- Chen, H. and Chan, D.C.: Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 18 (2006) 453-9.
- Chen, H. and Chan, D.C.: Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18 (2009) R169-76.
- Chen, H., Chomyn, A. and Chan, D.C.: Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280 (2005b) 26185-92.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E. and Chan, D.C.: Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160 (2003) 189-200.
- Chen, H., McCaffery, J.M. and Chan, D.C.: Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130 (2007a) 548-62.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M. and Chan, D.C.: Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141 (2010a) 280-9.
- Chen, J., Park, C.S. and Tang, S.J.: Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 281 (2006a) 11910-6.
- Chen, R.H., Ding, W.V. and McCormick, F.: Wnt signaling to beta-catenin involves two interactive components. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition and activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 275 (2000) 17894-9.
- Chen, S., Owens, G.C., Crossin, K.L. and Edelman, D.B.: Serotonin stimulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 36 (2007b) 472-83.
- Chen, S., Owens, G.C. and Edelman, D.B.: Dopamine inhibits mitochondrial motility in hippocampal neurons. *PLoS One* 3 (2008) e2804.
- Chen, S., Owens, G.C., Makarenkova, H. and Edelman, D.B.: HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. *PLoS One* 5 (2010b) e10848.

- Chen, Y.M., Gerwin, C. and Sheng, Z.H.: Dynein light chain LC8 regulates syntaphilin-mediated mitochondrial docking in axons. *J Neurosci* 29 (2009) 9429-38.
- Chen, Y.M., Wang, Q.J., Hu, H.S., Yu, P.C., Zhu, J., Drewes, G., Piwnica-Worms, H. and Luo, Z.G.: Microtubule affinity-regulating kinase 2 functions downstream of the PAR-3/PAR-6/atypical PKC complex in regulating hippocampal neuronal polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006b) 8534-9.
- Chenn, A.: Wnt/beta-catenin signaling in cerebral cortical development. *Organogenesis* 4 (2008) 76-80.
- Chenn, A. and Walsh, C.A.: Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297 (2002) 365-9.
- Cheyette, B.N.: Ryk: another heretical Wnt receptor defies the canon. *Sci STKE* 2004 (2004) pe54.
- Cho, D.H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z. and Lipton, S.A.: S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324 (2009) 102-5.
- Cho, D.H., Nakamura, T. and Lipton, S.A.: Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci* 67 (2010) 3435-47.
- Cho, K.I., Cai, Y., Yi, H., Yeh, A., Aslanukov, A. and Ferreira, P.A.: Association of the kinesin-binding domain of RanBP2 to KIF5B and KIF5C determines mitochondria localization and function. *Traffic* 8 (2007) 1722-35.
- Choi, S.Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J. and Frohman, M.A.: A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* 8 (2006) 1255-62.
- Chong, Z.Z. and Maiese, K.: Targeting WNT, protein kinase B, and mitochondrial membrane integrity to foster cellular survival in the nervous system. *Histol Histopathol* 19 (2004) 495-504.
- Chung, K.W., Kim, S.B., Park, K.D., Choi, K.G., Lee, J.H., Eun, H.W., Suh, J.S., Hwang, J.H., Kim, W.K., Seo, B.C., Kim, S.H., Son, I.H., Kim, S.M., Sunwoo, I.N. and Choi, B.O.: Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain* 129 (2006) 2103-18.
- D'Amico, M., Hult, J., Amanatullah, D.F., Zafonte, B.T., Albanese, C., Bouzahzah, B., Fu, M., Augenlicht, L.H., Donehower, L.A., Takemaru, K., Moon, R.T., Davis, R., Lisanti, M.P., Shtutman, M., Zhurinsky, J., Ben-Ze'ev, A., Troussard, A.A., Dedhar, S. and Pestell, R.G.: The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3beta and cAMP-responsive element-binding protein-dependent pathways. *J Biol Chem* 275 (2000) 32649-57.
- Da Cruz, S., Parone, P.A., Gonzalo, P., Bienvenut, W.V., Tondera, D., Jourdain, A., Quadroni, M. and Martinou, J.C.: SLP-2 interacts with prohibitins in the mitochondrial inner membrane and contributes to their stability. *Biochim Biophys Acta* 1783 (2008) 904-11.
- Dagda, R.K., Cherra, S.J., 3rd, Kulich, S.M., Tandon, A., Park, D. and Chu, C.T.: Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *J Biol Chem* 284 (2009) 13843-55.
- Dagda, R.K. and Chu, C.T.: Mitochondrial quality control: insights on how Parkinson's disease related genes PINK1, parkin, and Omi/HtrA2 interact to maintain mitochondrial homeostasis. *J Bioenerg Biomembr* 41 (2009) 473-9.
- Dall'Era, M.A., Oudes, A., Martin, D.B. and Liu, A.Y.: HSP27 and HSP70 interact with CD10 in C4-2 prostate cancer cells. *Prostate* 67 (2007) 714-21.
- Daniels, D.L., Eklof Spink, K. and Weis, W.I.: beta-catenin: molecular plasticity and drug design. *Trends Biochem Sci* 26 (2001) 672-8.

- Danilkovitch-Miagkova, A., Miagkov, A., Skeel, A., Nakaigawa, N., Zbar, B. and Leonard, E.J.: Oncogenic mutants of RON and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the beta-catenin pathway. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 5857-68.
- Davies, V.J., Hollins, A.J., Piechota, M.J., Yip, W., Davies, J.R., White, K.E., Nicols, P.P., Boulton, M.E. and Votruba, M.: Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet* 16 (2007) 1307-18.
- De, A.: Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43 (2011) 745-56.
- de Brito, O.M. and Scorrano, L.: Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456 (2008a) 605-10.
- de Brito, O.M. and Scorrano, L.: Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. *Antioxid Redox Signal* 10 (2008b) 621-33.
- De Ferrari, G.V. and Moon, R.T.: The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. *Oncogene* 25 (2006) 7545-53.
- De Vos, K.J. and Sheetz, M.P.: Visualization and quantification of mitochondrial dynamics in living animal cells. *Methods Cell Biol* 80 (2007) 627-82.
- Deas, E., Plun-Favreau, H., Gandhi, S., Desmond, H., Kjaer, S., Loh, S.H., Renton, A.E., Harvey, R.J., Whitworth, A.J., Martins, L.M., Abramov, A.Y. and Wood, N.W.: PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genet* 20 (2011) 867-79.
- Del Bo, R., Moggio, M., Rango, M., Bonato, S., D'Angelo, M.G., Ghezzi, S., Airoldi, G., Bassi, M.T., Guglieri, M., Napoli, L., Lamperti, C., Corti, S., Federico, A., Bresolin, N. and Comi, G.P.: Mutated mitofusin 2 presents with intrafamilial variability and brain mitochondrial dysfunction. *Neurology* 71 (2008) 1959-66.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelles, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. and Hamel, C.P.: Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26 (2000) 207-10.
- Delettre, C., Lenaers, G., Pelloquin, L., Belenguer, P. and Hamel, C.P.: OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 75 (2002) 97-107.
- Deng, H., Dodson, M.W., Huang, H. and Guo, M.: The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 14503-8.
- Deng, L., Hu, S., Baydoun, A.R., Chen, J., Chen, X. and Cong, X.: Aspirin induces apoptosis in mesenchymal stem cells requiring Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Prolif* 42 (2009) 721-30.
- Detmer, S.A. and Chan, D.C.: Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol* 176 (2007) 405-14.
- Detmer, S.A., Vande Velde, C., Cleveland, D.W. and Chan, D.C.: Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A. *Hum Mol Genet* 17 (2008) 367-75.
- Dickinson, M.E., Krumlauf, R. and McMahon, A.P.: Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development* 120 (1994) 1453-71.
- Dickson, B.J.: Wnts send axons up and down the spinal cord. *Nat Neurosci* 8 (2005) 1130-2.
- Dissanayake, S.K., Wade, M., Johnson, C.E., O'Connell, M.P., Leotlela, P.D., French, A.D.,

- Shah, K.V., Hewitt, K.J., Rosenthal, D.T., Indig, F.E., Jiang, Y., Nickoloff, B.J., Taub, D.D., Trent, J.M., Moon, R.T., Bittner, M. and Weeraratna, A.T.: The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282 (2007) 17259-71.
- Dodson, M.W. and Guo, M.: Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 17 (2007) 331-7.
- Dohm, J.A., Lee, S.J., Hardwick, J.M., Hill, R.B. and Gittis, A.G.: Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein fis1 adopts a TPR fold. *Proteins* 54 (2004) 153-6.
- Dominguez, I., Itoh, K. and Sokol, S.Y.: Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 8498-502.
- Dominguez, I., Sonenshein, G.E. and Seldin, D.C.: Protein kinase CK2 in health and disease: CK2 and its role in Wnt and NF-kappaB signaling: linking development and cancer. *Cell Mol Life Sci* 66 (2009) 1850-7.
- Dorheim, M.A., Tracey, W.R., Pollock, J.S. and Grammas, P.: Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 205 (1994) 659-65.
- Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M.F., Attardi, G., Larsson, N.G., Neupert, W. and Reichert, A.S.: Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 281 (2006) 37972-9.
- Ebbing, B., Mann, K., Starosta, A., Jaud, J., Schols, L., Schule, R. and Woehlke, G.: Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Hum Mol Genet* 17 (2008) 1245-52.
- Egger-Adam, D. and Katanaev, V.L.: The trimeric G protein Go inflicts a double impact on axin in the Wnt/frizzled signaling pathway. *Dev Dyn* 239 (2010) 168-83.
- Ehse, S., Raschke, I., Mancuso, G., Bernacchia, A., Geimer, S., Tondera, D., Martinou, J.C., Westermann, B., Rugarli, E.I. and Langer, T.: Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol* 187 (2009) 1023-36.
- El Wakil, A. and Lalli, E.: The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Mol Cell Endocrinol* 332 (2011) 32-7.
- Endo, Y. and Rubin, J.S.: Wnt signaling and neurite outgrowth: insights and questions. *Cancer Sci* 98 (2007) 1311-7.
- Escobar-Henriques, M., Westermann, B. and Langer, T.: Regulation of mitochondrial fusion by the F-box protein Mdm30 involves proteasome-independent turnover of Fzo1. *J Cell Biol* 173 (2006) 645-50.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A.: Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421 (2003) 753-6.
- Eura, Y., Ishihara, N., Oka, T. and Mihara, K.: Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J Cell Sci* 119 (2006) 4913-25.
- Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmstrom, K., Schiesling, C., Gispert, S., Carballo-Carbajal, I., Berg, D., Hoepken, H.H., Gasser, T., Kruger, R., Winklhofer, K.F., Vogel, F., Reichert, A.S., Auburger, G., Kahle, P.J., Schmid, B. and Haass, C.: Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27 (2007) 12413-8.
- Fabricius, C., Berthold, C.H. and Rydmark, M.: Axoplasmic organelles at nodes of Ranvier. II. Occurrence and distribution in large myelinated spinal cord axons of the adult cat. *J*

- Neurocytol 22 (1993) 941-54.
- Fagotto, F., Funayama, N., Gluck, U. and Gumbiner, B.M.: Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol* 132 (1996) 1105-14.
- Farias, G.G., Alfaro, I.E., Cerpa, W., Grabowski, C.P., Godoy, J.A., Bonansco, C. and Inestrosa, N.C.: Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 284 (2009) 15857-66.
- Farias, G.G., Godoy, J.A., Cerpa, W., Varela-Nallar, L. and Inestrosa, N.C.: Wnt signaling modulates pre- and postsynaptic maturation: therapeutic considerations. *Dev Dyn* 239 (2010) 94-101.
- Fatima, S., Lee, N.P. and Luk, J.M.: Dickkopfs and Wnt/beta-catenin signalling in liver cancer. *World J Clin Oncol* 2 (2011) 311-25.
- Faust, M. and Montenarh, M.: Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res* 301 (2000) 329-40.
- Ferreirinha, F., Quattrini, A., Pirozzi, M., Valsecchi, V., Dina, G., Broccoli, V., Auricchio, A., Piemonte, F., Tozzi, G., Gaeta, L., Casari, G., Ballabio, A. and Rugarli, E.I.: Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J Clin Invest* 113 (2004) 231-42.
- Figueroa-Romero, C., Iniguez-Lluhi, J.A., Stadler, J., Chang, C.R., Arnoult, D., Keller, P.J., Hong, Y., Blackstone, C. and Feldman, E.L.: SUMOylation of the mitochondrial fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. *Faseb J* 23 (2009) 3917-27.
- Finley, L.W. and Haigis, M.C.: The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev* 8 (2009) 173-88.
- Fischer, T., Guimera, J., Wurst, W. and Prakash, N.: Distinct but redundant expression of the Frizzled Wnt receptor genes at signaling centers of the developing mouse brain. *Neuroscience* 147 (2007) 693-711.
- Forrester, W.C., Kim, C. and Garriga, G.: The *Caenorhabditis elegans* Ror RTK CAM-1 inhibits EGL-20/Wnt signaling in cell migration. *Genetics* 168 (2004) 1951-62.
- Fradkin, L.G., Dura, J.M. and Noordermeer, J.N.: Ryks: new partners for Wnts in the developing and regenerating nervous system. *Trends Neurosci* 33 (2010) 84-92.
- Frank, S.: Dysregulation of mitochondrial fusion and fission: an emerging concept in neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 111 (2006) 93-100.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L. and Youle, R.J.: The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1 (2001) 515-25.
- Fransson, A., Ruusala, A. and Aspenstrom, P.: Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem* 278 (2003) 6495-502.
- Fransson, S., Ruusala, A. and Aspenstrom, P.: The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 344 (2006) 500-10.
- Frederick, R.L., McCaffery, J.M., Cunningham, K.W., Okamoto, K. and Shaw, J.M.: Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol* 167 (2004) 87-98.
- Frederick, R.L. and Shaw, J.M.: Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic* 8 (2007) 1668-75.
- Freese, J.L., Pino, D. and Pleasure, S.J.: Wnt signaling in development and disease. *Neurobiol Dis* 38 (2010) 148-53.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B. and Scorrano, L.: OPA1

- controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126 (2006) 177-89.
- Fujita, T., Maturana, A.D., Ikuta, J., Hamada, J., Walchli, S., Suzuki, T., Sawa, H., Wooten, M.W., Okajima, T., Tatematsu, K., Tanizawa, K. and Kuroda, S.: Axonal guidance protein FEZ1 associates with tubulin and kinesin motor protein to transport mitochondria in neurites of NGF-stimulated PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361 (2007) 605-10.
- Furt, F. and Moreau, P.: Importance of lipid metabolism for intracellular and mitochondrial membrane fusion/fission processes. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (2009) 1828-36.
- Galceran, J., Miyashita-Lin, E.M., Devaney, E., Rubenstein, J.L. and Grosschedl, R.: Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* 127 (2000) 469-82.
- Galganska, H., Karachitos, A., Wojtkowska, M., Stobienia, O., Budzinska, M. and Kmita, H.: Communication between mitochondria and nucleus: putative role for VDAC in reduction/oxidation mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1797 (2010) 1276-80.
- Gammie, A.E., Kurihara, L.J., Vallee, R.B. and Rose, M.D.: DNMI1, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *J Cell Biol* 130 (1995) 553-66.
- Gan, X.Q., Wang, J.Y., Xi, Y., Wu, Z.L., Li, Y.P. and Li, L.: Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. *J Cell Biol* 180 (2008) 1087-100.
- Gandhi, S., Muqit, M.M., Stanyer, L., Healy, D.G., Abou-Sleiman, P.M., Hargreaves, I., Heales, S., Ganguly, M., Parsons, L., Lees, A.J., Latchman, D.S., Holton, J.L., Wood, N.W. and Revesz, T.: PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain* 129 (2006) 1720-31.
- Gandre-Babbe, S. and van der Blik, A.M.: The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 19 (2008) 2402-12.
- Gao, C. and Chen, Y.G.: Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22 (2010) 717-27.
- Gao, Y. and Wang, H.Y.: Casein kinase 2 Is activated and essential for Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 281 (2006) 18394-400.
- Garcia-Frigola, C., Burgaya, F., Calbet, M., Lopez-Domenech, G., de Lecea, L. and Soriano, E.: A collection of cDNAs enriched in upper cortical layers of the embryonic mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 122 (2004) 133-50.
- Gartner, A., Huang, X. and Hall, A.: Neuronal polarity is regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3beta) independently of Akt/PKB serine phosphorylation. *J Cell Sci* 119 (2006) 3927-34.
- Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamburg, J.R. and Bradke, F.: Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci* 27 (2007) 13117-29.
- Gasser, T.: Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Rev Mol Med* 11 (2009) e22.
- Gautier, C.A., Kitada, T. and Shen, J.: Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 11364-9.
- Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.Y., Rojo, M., Schapira, A.H. and Taanman, J.W.: Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* 19 (2010) 4861-70.
- Geisler, S., Holmstrom, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J. and Springer, W.: PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and

- p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12 (2010) 119-31.
- Gindhart, J.G., Chen, J., Faulkner, M., Gandhi, R., Doerner, K., Wisniewski, T. and Nandlestadt, A.: The kinesin-associated protein UNC-76 is required for axonal transport in the *Drosophila* nervous system. *Mol Biol Cell* 14 (2003) 3356-65.
- Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S. and Schwarz, T.L.: Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* 173 (2006) 545-57.
- Glauser, L., Sonnay, S., Stafa, K. and Moore, D.J.: Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *J Neurochem* 118 (2011) 636-45.
- Gloss, B.S., Patterson, K.I., Barton, C.A., Gonzalez, M., Scurry, J.P., Hacker, N.F., Sutherland, R.L., O'Brien, P.M. and Clark, S.J.: Integrative genome-wide expression and promoter DNA methylation profiling identifies a potential novel panel of ovarian cancer epigenetic biomarkers. *Cancer Lett* (2011).
- Gogolla, N., Galimberti, I., Deguchi, Y. and Caroni, P.: Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron* 62 (2009) 510-25.
- Gomes, L.C., Di Benedetto, G. and Scorrano, L.: During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13 (2011) 589-98.
- Gong, C.X. and Iqbal, K.: Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem* 15 (2008) 2321-8.
- Gordon, M.D. and Nusse, R.: Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 281 (2006) 22429-33.
- Gorska-Andrzejak, J., Stowers, R.S., Borycz, J., Kostyleva, R., Schwarz, T.L. and Meinertzhagen, I.A.: Mitochondria are redistributed in *Drosophila* photoreceptors lacking milton, a kinesin-associated protein. *J Comp Neurol* 463 (2003) 372-88.
- Goto, M., Mitra, R.S., Liu, M., Lee, J., Henson, B.S., Carey, T., Bradford, C., Prince, M., Wang, C.Y., Fearon, E.R. and D'Silva, N.J.: Rap1 stabilizes beta-catenin and enhances beta-catenin-dependent transcription and invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 16 (2010) 65-76.
- Graham, N.A. and Asthagiri, A.R.: Epidermal growth factor-mediated T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional activity is essential but not sufficient for cell cycle progression in nontransformed mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 279 (2004) 23517-24.
- Green, J.L., Inoue, T. and Sternberg, P.W.: The *C. elegans* ROR receptor tyrosine kinase, CAM-1, non-autonomously inhibits the Wnt pathway. *Development* 134 (2007) 4053-62.
- Griparic, L., Kanazawa, T. and van der Bliek, A.M.: Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opal by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* 178 (2007) 757-64.
- Griparic, L., van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J. and van der Bliek, A.M.: Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* 279 (2004) 18792-8.
- Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A.N. and Aaronson, S.A.: Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev* 24 (2010) 2517-30.
- Guder, C., Philipp, I., Lengfeld, T., Watanabe, H., Hobmayer, B. and Holstein, T.W.: The Wnt code: cnidarians signal the way. *Oncogene* 25 (2006) 7450-60.
- Guillery, O., Malka, F., Frachon, P., Milea, D., Rojo, M. and Lombes, A.: Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts.

- Neuromuscul Disord 18 (2008a) 319-30.
- Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombes, A., Belenguer, P., Arnoult, D. and Rojo, M.: Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 100 (2008b) 315-25.
- Guo, X., Macleod, G.T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M.P., Atwood, H.L. and Zinsmaier, K.E.: The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron* 47 (2005) 379-93.
- Gwak, J., Cho, M., Gong, S.J., Won, J., Kim, D.E., Kim, E.Y., Lee, S.S., Kim, M., Kim, T.K., Shin, J.G. and Oh, S.: Protein-kinase-C-mediated beta-catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/beta-catenin pathway. *J Cell Sci* 119 (2006) 4702-9.
- Habas, R. and Dawid, I.B.: Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol* 4 (2005) 2.
- Habas, R., Dawid, I.B. and He, X.: Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* 17 (2003) 295-309.
- Habas, R., Kato, Y. and He, X.: Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell* 107 (2001) 843-54.
- Hajek, P., Chomyn, A. and Attardi, G.: Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J Biol Chem* 282 (2007) 5670-81.
- Hales, K.G. and Fuller, M.T.: Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90 (1997) 121-9.
- Hall, A.C., Brennan, A., Goold, R.G., Cleverley, K., Lucas, F.R., Gordon-Weeks, P.R. and Salinas, P.C.: Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons. *Mol Cell Neurosci* 20 (2002) 257-70.
- Hall, A.C., Lucas, F.R. and Salinas, P.C.: Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100 (2000) 525-35.
- Han, X.J., Lu, Y.F., Li, S.A., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A.C., Takei, K., Matsui, H. and Matsushita, M.: CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 182 (2008) 573-85.
- Han, X.J., Tomizawa, K., Fujimura, A., Ohmori, I., Nishiki, T., Matsushita, M. and Matsui, H.: Regulation of mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Acta Med Okayama* 65 (2010) 1-10.
- Harder, Z., Zunino, R. and McBride, H.: Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol* 14 (2004) 340-5.
- Hart, M., Concordet, J.P., Lassot, I., Albert, I., del los Santos, R., Durand, H., Perret, C., Rubinfeld, B., Margottin, F., Benarous, R. and Polakis, P.: The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 9 (1999) 207-10.
- Hatzfeld, M.: The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol* 186 (1999) 179-224.
- He, X., Saint-Jeannet, J.P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I. and Varmus, H.: A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* 275 (1997) 1652-4.
- Heese, K., Yamada, T., Akatsu, H., Yamamoto, T., Kosaka, K., Nagai, Y. and Sawada, T.: Characterizing the new transcription regulator protein p60TRP. *J Cell Biochem* 91 (2004) 1030-42.
- Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saude, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C. and Wilson, S.W.: Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405 (2000) 76-81.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W. and Reichert, A.S.: Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial

- morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 278 (2003) 27781-8.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J. and Shaw, J.M.: Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143 (1998) 359-73.
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. and Gotoh, Y.: The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131 (2004) 2791-801.
- Hirokawa, N. and Takemura, R.: Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res* 301 (2004) 50-9.
- Holmen, S.L., Salic, A., Zylstra, C.R., Kirschner, M.W. and Williams, B.O.: A novel set of Wnt-Frizzled fusion proteins identifies receptor components that activate beta - catenin-dependent signaling. *J Biol Chem* 277 (2002) 34727-35.
- Hollenbeck, P.J.: The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci* 1 (1996) d91-102.
- Hollenbeck, P.J. and Saxton, W.M.: The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118 (2005) 5411-9.
- Hollyday, M., McMahon, J.A. and McMahon, A.P.: Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mech Dev* 52 (1995) 9-25.
- Honda, A., Miyoshi, K., Baba, K., Taniguchi, M., Koyama, Y., Kuroda, S., Katayama, T. and Tohyama, M.: Expression of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) in the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 122 (2004) 89-92.
- Hooper, C., Killick, R. and Lovestone, S.: The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104 (2008) 1433-9.
- Hoppins, S., Edlich, F., Cleland, M.M., Banerjee, S., McCaffery, J.M., Youle, R.J. and Nunnari, J.: The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol Cell* 41 (2011) 150-60.
- Hoppins, S., Horner, J., Song, C., McCaffery, J.M. and Nunnari, J.: Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J Cell Biol* 184 (2009) 569-81.
- Hoppins, S., Lackner, L. and Nunnari, J.: The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76 (2007) 751-80.
- Hoppins, S. and Nunnari, J.: The molecular mechanism of mitochondrial fusion. *Biochim Biophys Acta* 1793 (2009) 20-6.
- Horn, S.C., Lalowski, M., Goehler, H., Droge, A., Wanker, E.E. and Stelzl, U.: Huntingtin interacts with the receptor sorting family protein GASP2. *J Neural Transm* 113 (2006) 1081-90.
- Horn, S.R., Thomenius, M.J., Johnson, E.S., Freel, C.D., Wu, J.Q., Coloff, J.L., Yang, C.S., Tang, W., An, J., Ilkayeva, O.R., Rathmell, J.C., Newgard, C.B. and Kornbluth, S.: Regulation of mitochondrial morphology by APC/CCdh1-mediated control of Drp1 stability. *Mol Biol Cell* 22 (2011) 1207-16.
- Hsia, N. and Cornwall, G.A.: DNA microarray analysis of region-specific gene expression in the mouse epididymis. *Biol Reprod* 70 (2004) 448-57.
- Hsieh, J.C.: Specificity of WNT-receptor interactions. *Front Biosci* 9 (2004) 1333-8.
- Huang, H. and Frohman, M.A.: Lipid signaling on the mitochondrial surface. *Biochim Biophys Acta* 1791 (2009) 839-44.
- Huang, H., Gao, Q., Peng, X., Choi, S.Y., Sarma, K., Ren, H., Morris, A.J. and Frohman, M.A.: piRNA-associated germline nuage formation and spermatogenesis require MitoPLD profusogenic mitochondrial-surface lipid signaling. *Dev Cell* 20 (2011) 376-87.
- Huang, P., Yu, T. and Yoon, Y.: Mitochondrial clustering induced by overexpression of the

- mitochondrial fusion protein Mfn2 causes mitochondrial dysfunction and cell death. *Eur J Cell Biol* 86 (2007) 289-302.
- Huang, R., Xing, Z., Luan, Z., Wu, T., Wu, X. and Hu, G.: A specific splicing variant of SVH, a novel human armadillo repeat protein, is up-regulated in hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 63 (2003) 3775-82.
- Huber, A.H., Nelson, W.J. and Weis, W.I.: Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90 (1997) 871-82.
- Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E.L., Stewart, J.D., He, L., Schaefer, A.M., Griffiths, P.G., Ahlqvist, K., Suomalainen, A., Reynier, P., McFarland, R., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F. and Taylor, R.W.: Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131 (2008) 329-37.
- Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F.: MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17 (2001) 754-5.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R. and Bollback, J.P.: Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294 (2001) 2310-4.
- Hur, E.M. and Zhou, F.Q.: GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 11 (2010) 539-51.
- Hurd, D.D. and Saxton, W.M.: Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in *Drosophila*. *Genetics* 144 (1996) 1075-85.
- Hutchins, B.I., Li, L. and Kalil, K.: Wnt/calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing corpus callosum. *Dev Neurobiol* 71 (2011) 269-83.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S. and Kikuchi, A.: Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J* 17 (1998) 1371-84.
- Ikeya, M., Lee, S.M., Johnson, J.E., McMahon, A.P. and Takada, S.: Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* 389 (1997) 966-70.
- Ikuta, J., Maturana, A., Fujita, T., Okajima, T., Tatematsu, K., Tanizawa, K. and Kuroda, S.: Fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) participates in the polarization of hippocampal neuron by controlling the mitochondrial motility. *Biochem Biophys Res Commun* 353 (2007) 127-32.
- Ilyas, M.: Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol* 205 (2005) 130-44.
- Ille, F., Atanasoski, S., Falk, S., Ittner, L.M., Marki, D., Buchmann-Moller, S., Wurdak, H., Suter, U., Taketo, M.M. and Sommer, L.: Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Dev Biol* 304 (2007) 394-408.
- Ille, F. and Sommer, L.: Wnt signaling: multiple functions in neural development. *Cell Mol Life Sci* 62 (2005) 1100-8.
- Imondi, R. and Thomas, J.B.: Neuroscience. The ups and downs of Wnt signaling. *Science* 302 (2003) 1903-4.
- Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Menager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M. and Kaibuchi, K.: CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4 (2001) 781-2.
- Inestrosa, N.C. and Toledo, E.M.: The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol Neurodegener* 3 (2008) 9.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E. and Nunnari, J.: Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170 (2005) 1021-7.

- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C.Y., He, X., MacDougald, O.A., You, M., Williams, B.O. and Guan, K.L.: TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126 (2006) 955-68.
- Inoue, T., Oz, H.S., Wiland, D., Gharib, S., Deshpande, R., Hill, R.J., Katz, W.S. and Sternberg, P.W.: *C. elegans* LIN-18 is a Ryk ortholog and functions in parallel to LIN-17/Frizzled in Wnt signaling. *Cell* 118 (2004) 795-806.
- Iseki, H., Takeda, A., Andoh, T., Takahashi, N., Kurochkin, I.V., Yarmishyn, A., Shimada, H., Okazaki, Y. and Koyama, I.: Human Arm protein lost in epithelial cancers, on chromosome X 1 (ALEX1) gene is transcriptionally regulated by CREB and Wnt/beta-catenin signaling. *Cancer Sci* 101 (2010) 1361-6.
- Ishihara, N., Eura, Y. and Mihara, K.: Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117 (2004) 6535-46.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. and Mihara, K.: Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *Embo J* 25 (2006) 2966-77.
- Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y. and Mihara, K.: Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 301 (2003) 891-8.
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., Taguchi, N., Morinaga, H., Maeda, M., Takayanagi, R., Yokota, S. and Mihara, K.: Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* 11 (2009) 958-66.
- Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R.T., Ninomiya-Tsuji, J. and Matsumoto, K.: The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 131-9.
- Ishizuka, K., Paek, M., Kamiya, A. and Sawa, A.: A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biol Psychiatry* 59 (2006) 1189-97.
- Israsena, N., Hu, M., Fu, W., Kan, L. and Kessler, J.A.: The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Dev Biol* 268 (2004) 220-31.
- Itoh, K., Brott, B.K., Bae, G.U., Ratcliffe, M.J. and Sokol, S.Y.: Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 280 (2005) 3.
- Ivaniutsin, U., Chen, Y., Mason, J.O., Price, D.J. and Pratt, T.: Adenomatous polyposis coli is required for early events in the normal growth and differentiation of the developing cerebral cortex. *Neural Dev* 4 (2009) 3.
- Jacinto, F.V., Ballestar, E., Roperio, S. and Esteller, M.: Discovery of epigenetically silenced genes by methylated DNA immunoprecipitation in colon cancer cells. *Cancer Res* 67 (2007) 11481-6.
- Jahani-Asl, A., Cheung, E.C., Neuspiel, M., MacLaurin, J.G., Fortin, A., Park, D.S., McBride, H.M. and Slack, R.S.: Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death. *J Biol Chem* 282 (2007) 23788-98.
- James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y. and Martinou, J.C.: hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278 (2003) 36373-9.
- James, R., Adams, R.R., Christie, S., Buchanan, S.R., Porteous, D.J. and Millar, J.K.: Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) is a multicompartimentalized protein that predominantly localizes to mitochondria. *Mol Cell Neurosci* 26 (2004) 112-22.
- Jamora, C. and Fuchs, E.: Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*

- Biol 4 (2002) E101-8.
- Jellali, A., Metz-Boutigue, M.H., Surgucheva, I., Jancsik, V., Schwartz, C., Filliol, D., Gelfand, V.I. and Rendon, A.: Structural and biochemical properties of kinesin heavy chain associated with rat brain mitochondria. *Cell Motil Cytoskeleton* 28 (1994) 79-93.
- Jenny, A., Reynolds-Kenneally, J., Das, G., Burnett, M. and Mlodzik, M.: Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nat Cell Biol* 7 (2005) 691-7.
- Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Therien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J., Chabot, B., Poirier, G.G., Hughes, T.R., Blanchette, M., Price, D.H. and Coulombe, B.: Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell* 27 (2007) 262-74.
- Ji, H., Wang, J., Nika, H., Hawke, D., Keezer, S., Ge, Q., Fang, B., Fang, X., Fang, D., Litchfield, D.W., Aldape, K. and Lu, Z.: EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of alpha-Catenin from beta-Catenin and transactivation of beta-Catenin. *Mol Cell* 36 (2009) 547-59.
- Jiang, H., Guo, W., Liang, X. and Rao, Y.: Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell* 120 (2005) 123-35.
- Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P. and Youle, R.J.: Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* 191 (2010) 933-42.
- Jin, Y.N. and Johnson, G.V.: The interrelationship between mitochondrial dysfunction and transcriptional dysregulation in Huntington disease. *J Bioenerg Biomembr* 42 (2010) 199-205.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. and Macara, I.G.: The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 531-9.
- John, G.B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C.A., Selker, J.M., Rangell, L., Bennett, M.J. and Zha, J.: The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell* 16 (2005) 1543-54.
- Jordan, B.K., Mohammed, M., Ching, S.T., Delot, E., Chen, X.N., Dewing, P., Swain, A., Rao, P.N., Elejalde, B.R. and Vilain, E.: Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 68 (2001) 1102-9.
- Jung, B., Kohler, A., Schambony, A. and Wedlich, D.: PAPC and the Wnt5a/Ror2 pathway control the invagination of the otic placode in *Xenopus*. *BMC Dev Biol* 11 (2011) 36.
- Jung, H., Kim, H.J., Lee, S.K., Kim, R., Kopachik, W., Han, J.K. and Jho, E.H.: Negative feedback regulation of Wnt signaling by Gbetagamma-mediated reduction of Dishevelled. *Exp Mol Med* 41 (2009) 695-706.
- Kahle, J.J., Gulbahce, N., Shaw, C.A., Lim, J., Hill, D.E., Barabasi, A.L. and Zoghbi, H.Y.: Comparison of an expanded ataxia interactome with patient medical records reveals a relationship between macular degeneration and ataxia. *Hum Mol Genet* 20 (2010) 510-27.
- Kang, E., Burdick, K.E., Kim, J.Y., Duan, X., Guo, J.U., Sailor, K.A., Jung, D.E., Ganesan, S., Choi, S., Pradhan, D., Lu, B., Avramopoulos, D., Christian, K., Malhotra, A.K., Song, H. and Ming, G.L.: Interaction between FEZ1 and DISC1 in regulation of neuronal development and risk for schizophrenia. *Neuron* 72 (2011) 559-71.
- Kang, J.S., Tian, J.H., Pan, P.Y., Zald, P., Li, C., Deng, C. and Sheng, Z.H.: Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell* 132 (2008) 137-48.

- Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D.C., Smith, C.L. and Youle, R.J.: Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* 164 (2004a) 493-9.
- Karbowski, M., Jeong, S.Y. and Youle, R.J.: Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 166 (2004b) 1027-39.
- Karbowski, M., Neutzner, A. and Youle, R.J.: The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* 178 (2007) 71-84.
- Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.Y. and Youle, R.J.: Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443 (2006) 658-62.
- Karbowski, M. and Youle, R.J.: Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10 (2003) 870-80.
- Kargl, J., Balenga, N., Platzer, W., Martini, L., Whistler, J. and Waldhoer, M.: The GPCR - associated sorting protein 1 regulates ligand-induced downregulation of GPR55. *Br J Pharmacol* (2011).
- Karren, M.A., Coonrod, E.M., Anderson, T.K. and Shaw, J.M.: The role of Fis1p-Mdv1p interactions in mitochondrial fission complex assembly. *J Cell Biol* 171 (2005) 291-301.
- Kasher, P.R., De Vos, K.J., Wharton, S.B., Manser, C., Bennett, E.J., Bingley, M., Wood, J.D., Milner, R., McDermott, C.J., Miller, C.C., Shaw, P.J. and Grierson, A.J.: Direct evidence for axonal transport defects in a novel mouse model of mutant spastin-induced hereditary spastic paraplegia (HSP) and human HSP patients. *J Neurochem* 110 (2009) 34-44.
- Katanaev, V.L.: The Wnt/Frizzled GPCR signaling pathway. *Biochemistry (Mosc)* 75 (2010) 1428-34.
- Katanaev, V.L., Ponzielli, R., Semeriva, M. and Tomlinson, A.: Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in *Drosophila*. *Cell* 120 (2005) 111-22.
- Kaul, S.C., Taira, K., Pereira-Smith, O.M. and Wadhwa, R.: Mortalin: present and prospective. *Exp Gerontol* 37 (2002) 1157-64.
- Kaytor, M.D. and Orr, H.T.: The GSK3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurobiol* 12 (2002) 275-8.
- Keeble, T.R. and Cooper, H.M.: Ryk: a novel Wnt receptor regulating axon pathfinding. *Int J Biochem Cell Biol* 38 (2006) 2011-7.
- Keeble, T.R., Halford, M.M., Seaman, C., Kee, N., Macheda, M., Anderson, R.B., Stacker, S.A. and Cooper, H.M.: The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci* 26 (2006) 5840-8.
- Kengaku, M., Twombly, V. and Tabin, C.: Expression of Wnt and Frizzled genes during chick limb bud development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62 (1997) 421-9.
- Kharaishvili, G., Simkova, D., Makharoblidze, E., Trtkova, K., Kolar, Z. and Bouchal, J.: Wnt signaling in prostate development and carcinogenesis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155 (2011) 11-8.
- Khodjakov, A., Lizunova, E.M., Minin, A.A., Koonce, M.P. and Gyoeva, F.K.: A specific light chain of kinesin associates with mitochondria in cultured cells. *Mol Biol Cell* 9 (1998) 333-43.
- Kijima, K., Numakura, C., Izumino, H., Umetsu, K., Nezu, A., Shiiki, T., Ogawa, M., Ishizaki, Y., Kitamura, T., Shozawa, Y. and Hayasaka, K.: Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum Genet* 116 (2005) 23-7.

- Kikuchi, A., Yamamoto, H. and Kishida, S.: Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal* 19 (2007) 659-71.
- Kim, C.H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K.B., Chandrasekharappa, S.C., Driever, W. and Chitnis, A.B.: Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* 407 (2000) 913-6.
- Kim, G.H. and Han, J.K.: JNK and ROKalpha function in the noncanonical Wnt/RhoA signaling pathway to regulate *Xenopus* convergent extension movements. *Dev Dyn* 232 (2005) 958-68.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. and Lemasters, J.J.: Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 462 (2007) 245-53.
- Kim, J.Y., Shen, S., Dietz, K., He, Y., Howell, O., Reynolds, R. and Casaccia, P.: HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. *Nat Neurosci* 13 (2010) 180-9.
- Kim, W.Y., Wang, X., Wu, Y., Doble, B.W., Patel, S., Woodgett, J.R. and Snider, W.D.: GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nat Neurosci* 12 (2009) 1390-7.
- Kinoshita, N., Iioka, H., Miyakoshi, A. and Ueno, N.: PKC delta is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements. *Genes Dev* 17 (2003) 1663-76.
- Kippert, F. and Gerloff, D.L.: Highly sensitive detection of individual HEAT and ARM repeats with HHpred and COACH. *PLoS One* 4 (2009) e7148.
- Kishida, M., Hino, S., Michiue, T., Yamamoto, H., Kishida, S., Fukui, A., Asashima, M. and Kikuchi, A.: Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* 276 (2001) 33147-55.
- Kishida, S., Yamamoto, H. and Kikuchi, A.: Wnt-3a and Dvl induce neurite retraction by activating Rho-associated kinase. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 4487-501.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. and Shimizu, N.: Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392 (1998) 605-8.
- Kittler, J.T., Hanley, J.G. and Isaac, J.T.R.: Transfecting and Transducing Neurons with Synthetic Nucleic Acids and Biologically Active Macromolecules. (2006).
- Kiyama, A., Isojima, Y. and Nagai, K.: Role of Per1-interacting protein of the suprachiasmatic nucleus in NGF mediated neuronal survival. *Biochem Biophys Res Commun* 339 (2006) 514-9.
- Kohn, A.D. and Moon, R.T.: Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38 (2005) 439-46.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Clevers, H.: Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275 (1997) 1784-7.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M. and Chan, D.C.: Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305 (2004) 858-62.
- Koutsopoulos, O.S., Laine, D., Osellame, L., Chudakov, D.M., Parton, R.G., Frazier, A.E. and Ryan, M.T.: Human Mitons associate with mitochondria and induce microtubule-dependent remodeling of mitochondrial networks. *Biochim Biophys Acta* 1803 (2011) 564-74.
- Koval, A., Purvanov, V., Egger-Adam, D. and Katanaev, V.L.: Yellow submarine of the Wnt/Frizzled signaling: Submerging from the G protein harbor to the targets. *Biochem Pharmacol* (2011).
- Koyanagi, M., Iwasaki, M., Haendeler, J., Leitges, M., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S.: Wnt5a increases cardiac gene expressions of cultured human circulating progenitor cells via a

- PKC delta activation. *PLoS One* 4 (2009) e5765.
- Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A.C., Geula, C., Kowall, N.W. and Khrapko, K.: Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 38 (2006) 518-20.
- Kriegstein, A., Noctor, S. and Martinez-Cerdeno, V.: Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci* 7 (2006) 883-90.
- Krig, S.R., Jin, V.X., Bieda, M.C., O'Geen, H., Yaswen, P., Green, R. and Farnham, P.J.: Identification of genes directly regulated by the oncogene ZNF217 using chromatin immunoprecipitation (ChIP)-chip assays. *J Biol Chem* 282 (2007) 9703-12.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. and Resche-Rigon, M.: The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60 (1998) 619-42.
- Kroemer, G. and Reed, J.C.: Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6 (2000) 513-9.
- Krylova, O., Herreros, J., Cleverley, K.E., Ehler, E., Henriquez, J.P., Hughes, S.M. and Salinas, P.C.: WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. *Neuron* 35 (2002) 1043-56.
- Krylova, O., Messenger, M.J. and Salinas, P.C.: Dishevelled-1 regulates microtubule stability: a new function mediated by glycogen synthase kinase-3beta. *J Cell Biol* 151 (2000) 83-94.
- Kuhl, M.: The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* 9 (2004) 967-74.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Malbon, C.C. and Moon, R.T.: Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* 275 (2000a) 12701-11.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R. and Moon, R.T.: The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16 (2000b) 279-83.
- Kurochkin, I.V., Yonemitsu, N., Funahashi, S.I. and Nomura, H.: ALEX1, a novel human armadillo repeat protein that is expressed differentially in normal tissues and carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 280 (2001) 340-7.
- Kuroda, S., Nakagawa, N., Tokunaga, C., Tatematsu, K. and Tanizawa, K.: Mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* UNC-76 protein involved in axonal outgrowth is a protein kinase C zeta-interacting protein. *J Cell Biol* 144 (1999) 403-11.
- Kuwahara, A., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P.S., Taketo, M.M., Sakai, J., Kodama, T. and Gotoh, Y.: Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development* 137 (2010) 1035-44.
- Kwong, J.Q., Beal, M.F. and Manfredi, G.: The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 97 (2006) 1659-75.
- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A. and van der Blik, A.M.: *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* 4 (1999) 815-26.
- Lackner, L.L., Horner, J.S. and Nunnari, J.: Mechanistic analysis of a dynamin effector. *Science* 325 (2009) 874-7.
- Lackner, L.L. and Nunnari, J.M.: The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim Biophys Acta* 1792 (2009) 1138-44.
- Langford, G.M.: Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 3 (2002) 859-65.
- Larouche, M. and Hawkes, R.: From clusters to stripes: the developmental origins of adult cerebellar compartmentation. *Cerebellum* 5 (2006) 77-88.
- Latres, E., Chiaur, D.S. and Pagano, M.: The human F box protein beta-Trcp associates with

- the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* 18 (1999) 849-54.
- Lau, E., Kluger, H., Varsano, T., Lee, K., Scheffler, I., Rimm, D.L., Ideker, T. and Ronai, Z.A.: PKCepsilon Promotes Oncogenic Functions of ATF2 in the Nucleus while Blocking Its Apoptotic Function at Mitochondria. *Cell* 148 (2012) 543-55.
- Lawson, V.H., Graham, B.V. and Flanigan, K.M.: Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology* 65 (2005) 197-204.
- Lee, E., Salic, A. and Kirschner, M.W.: Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon. *J Cell Biol* 154 (2001) 983-93.
- Lee, J.M., Kim, I.S., Kim, H., Lee, J.S., Kim, K., Yim, H.Y., Jeong, J., Kim, J.H., Kim, J.Y., Lee, H., Seo, S.B., Kim, H., Rosenfeld, M.G., Kim, K.I. and Baek, S.H.: RORalpha attenuates Wnt/beta-catenin signaling by PKCalpha-dependent phosphorylation in colon cancer. *Mol Cell* 37 (2010) 183-95.
- Lee, J.S., Ishimoto, A. and Yanagawa, S.: Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem* 274 (1999) 21464-70.
- Lee, S.M., Tole, S., Grove, E. and McMahon, A.P.: A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127 (2000) 457-67.
- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L. and Youle, R.J.: Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15 (2004) 5001-11.
- Lee, Y.N., Gao, Y. and Wang, H.Y.: Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3. *Cell Signal* 20 (2008) 443-52.
- Legesse-Miller, A., Massol, R.H. and Kirchhausen, T.: Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 14 (2003) 1953-63.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P. and Rojo, M.: Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13 (2002) 4343-54.
- Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombes, A. and Rojo, M.: Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* 117 (2004) 2653-62.
- Li, C., Chen, H., Hu, L., Xing, Y., Sasaki, T., Villosio, M.F., Li, J., Nishita, M., Minami, Y. and Minoo, P.: Ror2 modulates the canonical Wnt signaling in lung epithelial cells through cooperation with Fzd2. *BMC Mol Biol* 9 (2008a) 11.
- Li, F., Chong, Z.Z. and Maiese, K.: Winding through the WNT pathway during cellular development and demise. *Histol Histopathol* 21 (2006) 103-24.
- Li, L., Hutchins, B.I. and Kalil, K.: Wnt5a induces simultaneous cortical axon outgrowth and repulsive axon guidance through distinct signaling mechanisms. *J Neurosci* 29 (2009) 5873-83.
- Li, L., Hutchins, B.I. and Kalil, K.: Wnt5a induces simultaneous cortical axon outgrowth and repulsive turning through distinct signaling mechanisms. *Sci Signal* 3 (2010) pt2.
- Li, L., Yuan, H., Xie, W., Mao, J., Caruso, A.M., McMahon, A., Sussman, D.J. and Wu, D.: Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* 274 (1999) 129-34.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X.: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 (1997) 479-89.
- Li, Q., Lau, A., Morris, T.J., Guo, L., Fordyce, C.B. and Stanley, E.F.: A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci* 24 (2004a) 4070-81.
- Li, W., Bengtson, M.H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V.A., Orth, A., Chanda, S.K., Batalov, S. and Joazeiro, C.A.: Genome-wide and functional annotation of human E3

- ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 3 (2008b) e1487.
- Li, X., Yost, H.J., Virshup, D.M. and Seeling, J.M.: Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in *Xenopus*. *Embo J* 20 (2001) 4122-31.
- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. and Sheng, M.: The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119 (2004b) 873-87.
- Liang, H., Coles, A.H., Zhu, Z., Zayas, J., Jurecic, R., Kang, J. and Jones, S.N.: Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *J Exp Med* 204 (2007) 3077-84.
- Liao, G., Tao, Q., Kofron, M., Chen, J.S., Schloemer, A., Davis, R.J., Hsieh, J.C., Wylie, C., Heasman, J. and Kuan, C.Y.: Jun NH2-terminal kinase (JNK) prevents nuclear beta-catenin accumulation and regulates axis formation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 16313-8.
- Liesa, M., Palacin, M. and Zorzano, A.: Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 89 (2009) 799-845.
- Ligon, L.A. and Steward, O.: Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol* 427 (2000) 351-61.
- Lin, D., Edwards, A.S., Fawcett, J.P., Mbamalu, G., Scott, J.D. and Pawson, T.: A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 540-7.
- Litchfield, D.W.: Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369 (2003) 1-15.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. and He, X.: Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108 (2002) 837-47.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R. and Bradley, A.: Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 22 (1999a) 361-5.
- Liu, T., DeCostanzo, A.J., Liu, X., Wang, H., Hallagan, S., Moon, R.T. and Malbon, C.C.: G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway. *Science* 292 (2001) 1718-22.
- Liu, T., Liu, X., Wang, H., Moon, R.T. and Malbon, C.C.: Activation of rat frizzled-1 promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via pathways that require Galpha(q) and Galpha(o) function. *J Biol Chem* 274 (1999b) 33539-44.
- Liu, W., Sato, A., Khadka, D., Bharti, R., Diaz, H., Runnels, L.W. and Habas, R.: Mechanism of activation of the Formin protein Daam1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 210-5.
- Liu, X. and Hajnoczky, G.: Ca²⁺-dependent regulation of mitochondrial dynamics by the Miro-Milton complex. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (2009) 1972-6.
- Liu, X., Liu, T., Slusarski, D.C., Yang-Snyder, J., Malbon, C.C., Moon, R.T. and Wang, H.: Activation of a frizzled-2/beta-adrenergic receptor chimera promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via Galphao and Galphat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999c) 14383-8.
- Liu, X., Rubin, J.S. and Kimmel, A.R.: Rapid, Wnt-induced changes in GSK3beta associations that regulate beta-catenin stabilization are mediated by Galpha proteins. *Curr Biol* 15 (2005a) 1989-97.
- Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O. and Hajnoczky, G.: Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *Embo J* 28 (2009) 3074-89.

- Liu, Y., Shi, J., Lu, C.C., Wang, Z.B., Lyuksyutova, A.I., Song, X.J. and Zou, Y.: Ryk-mediated Wnt repulsion regulates posterior-directed growth of corticospinal tract. *Nat Neurosci* 8 (2005b) 1151-9.
- Liu, Z. and Butow, R.A.: Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* 40 (2006) 159-85.
- Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J. and Baltimore, D.: Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295 (2002) 868-72.
- Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B. and Baltimore, D.: Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119 (2004) 97-108.
- Lucas, F.R., Goold, R.G., Gordon-Weeks, P.R. and Salinas, P.C.: Inhibition of GSK-3 β leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J Cell Sci* 111 (Pt 10) (1998) 1351-61.
- Lucas, F.R. and Salinas, P.C.: WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev Biol* 192 (1997) 31-44.
- Luna-Ulloa, L.B., Hernandez-Maqueda, J.G., Castaneda-Patlan, M.C. and Robles-Flores, M.: Protein kinase C in Wnt signaling: Implications in cancer initiation and progression. *IUBMB Life* 63 (2011) 873-9.
- Lutz, A.K., Exner, N., Fett, M.E., Schlehe, J.S., Kloos, K., Lammermann, K., Brunner, B., Kurz-Drexler, A., Vogel, F., Reichert, A.S., Bouman, L., Vogt-Weisenhorn, D., Wurst, W., Tatzelt, J., Haass, C. and Winklhofer, K.F.: Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* 284 (2009) 22938-51.
- Ly, C.V. and Verstreken, P.: Mitochondria at the synapse. *Neuroscientist* 12 (2006) 291-9.
- Lyons, J.P., Mueller, U.W., Ji, H., Everett, C., Fang, X., Hsieh, J.C., Barth, A.M. and McCrea, P.D.: Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/beta-catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res* 298 (2004) 369-87.
- Lyu, J., Yamamoto, V. and Lu, W.: Cleavage of the Wnt receptor Ryk regulates neuronal differentiation during cortical neurogenesis. *Dev Cell* 15 (2008) 773-80.
- Lyuksyutova, A.I., Lu, C.C., Milanesio, N., King, L.A., Guo, N., Wang, Y., Nathans, J., Tessier-Lavigne, M. and Zou, Y.: Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* 302 (2003) 1984-8.
- Ma, H., Cai, Q., Lu, W., Sheng, Z.H. and Mochida, S.: KIF5B motor adaptor syntabulin maintains synaptic transmission in sympathetic neurons. *J Neurosci* 29 (2009) 13019-29.
- Ma, L. and Wang, H.Y.: Suppression of cyclic GMP-dependent protein kinase is essential to the Wnt/cGMP/Ca²⁺ pathway. *J Biol Chem* 281 (2006) 30990-1001.
- Ma, Z., Izumi, H., Kanai, M., Kabuyama, Y., Ahn, N.G. and Fukasawa, K.: Mortalin controls centrosome duplication via modulating centrosomal localization of p53. *Oncogene* 25 (2006) 5377-90.
- MacAskill, A.F., Atkin, T.A. and Kittler, J.T.: Mitochondrial trafficking and the provision of energy and calcium buffering at excitatory synapses. *Eur J Neurosci* 32 (2010) 231-40.
- MacAskill, A.F., Brickley, K., Stephenson, F.A. and Kittler, J.T.: GTPase dependent recruitment of Grif-1 by Miro1 regulates mitochondrial trafficking in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 40 (2009a) 301-12.
- MacAskill, A.F. and Kittler, J.T.: Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol* 20 (2010) 102-12.
- MacAskill, A.F., Rinholm, J.E., Twelvetrees, A.E., Arancibia-Carcamo, I.L., Muir, J., Fransson, A., Aspenstrom, P., Attwell, D. and Kittler, J.T.: Miro1 is a calcium sensor

- for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron* 61 (2009b) 541-55.
- Macdonald, B.T., Semenov, M.V. and He, X.: SnapShot: Wnt/beta-catenin signaling. *Cell* 131 (2007) 1204.
- MacDonald, B.T., Tamai, K. and He, X.: Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17 (2009) 9-26.
- Machon, O., Backman, M., Machonova, O., Kozmik, Z., Vacik, T., Andersen, L. and Krauss, S.: A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus. *Dev Biol* 311 (2007) 223-37.
- Mai, S., Klinkenberg, M., Auburger, G., Bereiter-Hahn, J. and Jendrach, M.: Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J Cell Sci* 123 (2010) 917-26.
- Mak, B.C., Kenerson, H.L., Aicher, L.D., Barnes, E.A. and Yeung, R.S.: Aberrant beta-catenin signaling in tuberous sclerosis. *Am J Pathol* 167 (2005) 107-16.
- Manczak, M., Calkins, M.J. and Reddy, P.H.: Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20 (2011) 2495-509.
- Mandemakers, W., Morais, V.A. and De Strooper, B.: A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *J Cell Sci* 120 (2007) 1707-16.
- Manjarres, I.M., Alonso, M.T. and Garcia-Sancho, J.: Calcium entry-calcium refilling (CECR) coupling between store-operated Ca(2+) entry and sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Cell Calcium* 49 (2011) 153-61.
- Manjarres, I.M., Chamero, P., Domingo, B., Molina, F., Llopis, J., Alonso, M.T. and Garcia-Sancho, J.: Red and green aequorins for simultaneous monitoring of Ca²⁺ signals from two different organelles. *Pflugers Arch* 455 (2008) 961-70.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., 3rd, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L. and Wu, D.: Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7 (2001) 801-9.
- Mao, Y., Ge, X., Frank, C.L., Madison, J.M., Koehler, A.N., Doud, M.K., Tassa, C., Berry, E.M., Soda, T., Singh, K.K., Biechele, T., Petryshen, T.L., Moon, R.T., Haggarty, S.J. and Tsai, L.H.: Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell* 136 (2009) 1017-31.
- Marin, O. and Rubenstein, J.L.: Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26 (2003) 441-83.
- Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D. and Solnica-Krezel, L.: Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Curr Biol* 12 (2002) 876-84.
- Martin, R., Vaida, B., Bleher, R., Crispino, M. and Giuditta, A.: Protein synthesizing units in presynaptic and postsynaptic domains of squid neurons. *J Cell Sci* 111 (Pt 21) (1998) 3157-66.
- Martini, L., Thompson, D., Kharazia, V. and Whistler, J.L.: Differential regulation of behavioral tolerance to WIN55,212-2 by GASP1. *Neuropsychopharmacology* 35 (2010) 1363-73.
- Martini, L., Waldhoer, M., Pusch, M., Kharazia, V., Fong, J., Lee, J.H., Freissmuth, C. and Whistler, J.L.: Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is

- mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *Faseb J* 21 (2007) 802-11.
- Mathis, C., Bott, J.B., Candusso, M.P., Simonin, F. and Cassel, J.C.: Impaired striatum-dependent behavior in GASP-1-knock-out mice. *Genes Brain Behav* (2010).
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N. and Tanaka, K.: PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189 (2010) 211-21.
- Matsuki, T., Kiyama, A., Kawabuchi, M., Okada, M. and Nagai, K.: A novel protein interacts with a clock-related protein, rPer1. *Brain Res* 916 (2001) 1-10.
- Mattenberger, Y., James, D.I. and Martinou, J.C.: Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin. *FEBS Lett* 538 (2003) 53-9.
- Matthews, H.K., Marchant, L., Carmona-Fontaine, C., Kuriyama, S., Larrain, J., Holt, M.R., Parsons, M. and Mayor, R.: Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development* 135 (2008) 1771-80.
- Maye, P., Zheng, J., Li, L. and Wu, D.: Multiple mechanisms for Wnt11-mediated repression of the canonical Wnt signaling pathway. *J Biol Chem* 279 (2004) 24659-65.
- McCaffrey, L.M. and Macara, I.G.: Widely conserved signaling pathways in the establishment of cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (2009) a001370.
- McDermott, C.J., Grierson, A.J., Wood, J.D., Bingley, M., Wharton, S.B., Bushby, K.M. and Shaw, P.J.: Hereditary spastic paraparesis: disrupted intracellular transport associated with spastin mutation. *Ann Neurol* 54 (2003a) 748-59.
- McDermott, C.J., Taylor, R.W., Hayes, C., Johnson, M., Bushby, K.M., Turnbull, D.M. and Shaw, P.J.: Investigation of mitochondrial function in hereditary spastic paraparesis. *Neuroreport* 14 (2003b) 485-8.
- McMahon, A.P. and Bradley, A.: The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62 (1990) 1073-85.
- McMahon, A.P., Joyner, A.L., Bradley, A. and McMahon, J.A.: The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69 (1992) 581-95.
- McMahon, A.P. and Moon, R.T.: Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* 58 (1989) 1075-84.
- Mears, J.A., Lackner, L.L., Fang, S., Ingerman, E., Nunnari, J. and Hinshaw, J.E.: Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol* 18 (2011) 20-6.
- Medina, A., Reintsch, W. and Steinbeisser, H.: *Xenopus* frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mech Dev* 92 (2000) 227-37.
- Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J.P. and Lombes, A.: Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9 (2009) 331-9.
- Medrano, E.E.: Wnt5a and PKC, a deadly partnership involved in melanoma invasion. *Pigment Cell Res* 20 (2007) 258-9.
- Megason, S.G. and McMahon, A.P.: A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129 (2002) 2087-98.
- Meissner, C., Lorenz, H., Weihofen, A., Selkoe, D.J. and Lemberg, M.K.: The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *J*

- Neurochem 117 (2011) 856-67.
- Melton, K.R., Iulianella, A. and Trainor, P.A.: Gene expression and regulation of hindbrain and spinal cord development. *Front Biosci* 9 (2004) 117-38.
- Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Lower, B., Wunderlich, F.T., von Kleist-Retzow, J.C., Waisman, A., Westermann, B. and Langer, T.: Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev* 22 (2008) 476-88.
- Merkwirth, C. and Langer, T.: Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. *Cell* 135 (2008) 1165-7.
- Merz, S., Hammermeister, M., Altmann, K., Durr, M. and Westermann, B.: Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biol Chem* 388 (2007) 917-26.
- Meuer, K., Suppanz, I.E., Lingor, P., Planchamp, V., Goricke, B., Fichtner, L., Braus, G.H., Dietz, G.P., Jakobs, S., Bahr, M. and Weishaupt, J.H.: Cyclin-dependent kinase 5 is an upstream regulator of mitochondrial fission during neuronal apoptosis. *Cell Death Differ* 14 (2007) 651-61.
- Mezhybovska, M., Yudina, Y., Abhyankar, A. and Sjolander, A.: Beta-catenin is involved in alterations in mitochondrial activity in non-transformed intestinal epithelial and colon cancer cells. *Br J Cancer* 101 (2009) 1596-605.
- Mikels, A.J. and Nusse, R.: Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4 (2006) e115.
- Millar, J.K., James, R., Christie, S. and Porteous, D.J.: Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): subcellular targeting and induction of ring mitochondria. *Mol Cell Neurosci* 30 (2005) 477-84.
- Miller, K.E. and Sheetz, M.P.: Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci* 117 (2004) 2791-804.
- Minami, Y., Oishi, I., Endo, M. and Nishita, M.: Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases. *Dev Dyn* 239 (2010) 1-15.
- Ming, G.L. and Song, H.: DISC1 partners with GSK3beta in neurogenesis. *Cell* 136 (2009) 990-2.
- Mironov, S.L.: Spontaneous and evoked neuronal activities regulate movements of single neuronal mitochondria. *Synapse* 59 (2006) 403-11.
- Mironov, S.L.: ADP regulates movements of mitochondria in neurons. *Biophys J* 92 (2007) 2944-52.
- Mironov, S.L.: Complexity of mitochondrial dynamics in neurons and its control by ADP produced during synaptic activity. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (2009) 2005-14.
- Mishra, M., Manavalan, A., Sze, S.K. and Heese, K.: Neuronal p60TRP expression modulates cardiac capacity. *J Proteomics* (2011).
- Misko, A., Jiang, S., Wegorzewska, I., Milbrandt, J. and Baloh, R.H.: Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 30 (2010) 4232-40.
- Miyoshi, K., Honda, A., Baba, K., Taniguchi, M., Oono, K., Fujita, T., Kuroda, S., Katayama, T. and Tohyama, M.: Disrupted-In-Schizophrenia 1, a candidate gene for schizophrenia, participates in neurite outgrowth. *Mol Psychiatry* 8 (2003) 685-94.
- Mochly-Rosen, D. and Gordon, A.S.: Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *Faseb J* 12 (1998) 35-42.
- Moeller, H., Jenny, A., Schaeffer, H.J., Schwarz-Romond, T., Mlodzik, M., Hammerschmidt, M. and Birchmeier, W.: Diversin regulates heart formation and gastrulation movements in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 15900-5.
- Montcouquiol, M., Crenshaw, E.B., 3rd and Kelley, M.W.: Noncanonical Wnt signaling and

- neural polarity. *Annu Rev Neurosci* 29 (2006) 363-86.
- Montero, M., Alonso, M.T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A.G., Garcia-Sancho, J. and Alvarez, J.: Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 57-61.
- Moon, R.T., Campbell, R.M., Christian, J.L., McGrew, L.L., Shih, J. and Fraser, S.: Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development* 119 (1993) 97-111.
- Moran, L.B. and Graeber, M.B.: Towards a pathway definition of Parkinson's disease: a complex disorder with links to cancer, diabetes and inflammation. *Neurogenetics* 9 (2008) 1-13.
- Morel, M., Authelet, M., Dedecker, R. and Brion, J.P.: Glycogen synthase kinase-3 β and the p25 activator of cyclin dependent kinase 5 increase pausing of mitochondria in neurons. *Neuroscience* 167 (2010) 1044-56.
- Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N. and Brady, S.T.: Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *Embo J* 21 (2002) 281-93.
- Moriguchi, T., Kawachi, K., Kamakura, S., Masuyama, N., Yamanaka, H., Matsumoto, K., Kikuchi, A. and Nishida, E.: Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates. *J Biol Chem* 274 (1999) 30957-62.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W.: Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275 (1997) 1787-90.
- Morris, R.L. and Hollenbeck, P.J.: The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci* 104 (Pt 3) (1993) 917-27.
- Morris, R.L. and Hollenbeck, P.J.: Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* 131 (1995) 1315-26.
- Moser, E., Kargl, J., Whistler, J.L., Waldhoer, M. and Tschische, P.: G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors. *Pharmacology* 86 (2010) 22-9.
- Mou, Z., Tapper, A.R. and Gardner, P.D.: The armadillo repeat-containing protein, ARMCX3, physically and functionally interacts with the developmental regulatory factor Sox10. *J Biol Chem* 284 (2009) 13629-40.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M. and Shaw, J.M.: Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 151 (2000) 367-80.
- Munji, R.N., Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J.A. and Pleasure, S.J.: Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J Neurosci* 31 (2011) 1676-87.
- Munoz, R., Moreno, M., Oliva, C., Orbenes, C. and Larrain, J.: Syndecan-4 regulates non-canonical Wnt signalling and is essential for convergent and extension movements in *Xenopus* embryos. *Nat Cell Biol* 8 (2006) 492-500.
- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H. and Takada, S.: Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev* 16 (2002) 548-53.
- Mutch, C.A., Schulte, J.D., Olson, E. and Chenn, A.: Beta-catenin signaling negatively regulates intermediate progenitor population numbers in the developing cortex. *PLoS One* 5 (2010) e12376.
- Nagata, T.: Electron microscopic radioautographic study on protein synthesis in hepatocyte mitochondria of aging mice. *ScientificWorldJournal* 6 (2006) 1583-98.

- Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S. and Hirose, S.: MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep* 7 (2006) 1019-22.
- Nakamura, T., Cieplak, P., Cho, D.H., Godzik, A. and Lipton, S.A.: S-nitrosylation of Drp1 links excessive mitochondrial fission to neuronal injury in neurodegeneration. *Mitochondrion* 10 (2010) 573-8.
- Nakamura, T. and Lipton, S.A.: Redox modulation by S-nitrosylation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* (2011).
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. and Ohsumi, Y.: Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (2009) 458-67.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H. and Hirokawa, N.: KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79 (1994) 1209-20.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F. and Youle, R.J.: Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183 (2008) 795-803.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R. and Youle, R.J.: PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 8 (2010) e1000298.
- Nelson, M.R. and Chazin, W.J.: Structures of EF-hand Ca(2+)-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca²⁺ binding. *Biometals* 11 (1998) 297-318.
- Nelson, W.J. and Nusse, R.: Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303 (2004) 1483-7.
- Neuspiel, M., Schauss, A.C., Braschi, E., Zunino, R., Rippstein, P., Rachubinski, R.A., Andrade-Navarro, M.A. and McBride, H.M.: Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol* 18 (2008) 102-8.
- Nicholls, D.G. and Budd, S.L.: Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80 (2000) 315-60.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A. and Suter, U.: Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 170 (2005) 1067-78.
- Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J.L. and Muller, U.: Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* 74 (2004) 558-63.
- Nishimura, T., Kato, K., Yamaguchi, T., Fukata, Y., Ohno, S. and Kaibuchi, K.: Role of the PAR-3-KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nat Cell Biol* 6 (2004) 328-34.
- Nishita, M., Yoo, S.K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A. and Minami, Y.: Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J Cell Biol* 175 (2006) 555-62.
- Noles, S.R. and Chenn, A.: Cadherin inhibition of beta-catenin signaling regulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 35 (2007) 549-58.
- Noordermeer, J., Klingensmith, J., Perrimon, N. and Nusse, R.: dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*. *Nature* 367 (1994) 80-3.
- Novak, A. and Dedhar, S.: Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci* 56 (1999) 523-37.
- Nusse, R.: An ancient cluster of Wnt paralogues. *Trends Genet* 17 (2001) 443.

- Nusse, R.: Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15 (2005) 28-32.
- Nusse, R. and Varmus, H.E.: Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31 (1982) 99-109.
- O'Connell, M.P., Fiori, J.L., Xu, M., Carter, A.D., Frank, B.P., Camilli, T.C., French, A.D., Dissanayake, S.K., Indig, F.E., Bernier, M., Taub, D.D., Hewitt, S.M. and Weeraratna, A.T.: The orphan tyrosine kinase receptor, ROR2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma. *Oncogene* 29 (2010) 34-44.
- O'Toole, M., Latham, R., Baqri, R.M. and Miller, K.E.: Modeling mitochondrial dynamics during in vivo axonal elongation. *J Theor Biol* 255 (2008) 369-77.
- Ohno, S.: Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13 (2001) 641-8.
- Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G.C., Mundlos, S., Shibuya, H., Takada, S. and Minami, Y.: The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8 (2003) 645-54.
- Okamoto, K. and Shaw, J.M.: Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39 (2005) 503-36.
- Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y.S., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., Tanaka, K. and Matsuda, N.: p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells* 15 (2010) 887-900.
- Okerlund, N.D. and Cheyette, B.N.: Synaptic Wnt signaling-a contributor to major psychiatric disorders? *J Neurodev Disord* 3 (2011) 162-74.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. and Lenaers, G.: Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278 (2003) 7743-6.
- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., Ducommun, B., Lenaers, G. and Belenguer, P.: The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 523 (2002) 171-6.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. and Mann, M.: Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127 (2006) 635-48.
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. and Hayashi, J.I.: Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet* 28 (2001) 272-5.
- Orford, K., Crockett, C., Jensen, J.P., Weissman, A.M. and Byers, S.W.: Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* 272 (1997) 24735-8.
- Orme, M.H., Giannini, A.L., Vivanco, M.D. and Kypta, R.M.: Glycogen synthase kinase-3 and Axin function in a beta-catenin-independent pathway that regulates neurite outgrowth in neuroblastoma cells. *Mol Cell Neurosci* 24 (2003) 673-86.
- Orr, A.L., Li, S., Wang, C.E., Li, H., Wang, J., Rong, J., Xu, X., Mastroberardino, P.G., Greenamyre, J.T. and Li, X.J.: N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J Neurosci* 28 (2008) 2783-92.
- Otera, H. and Mihara, K.: Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J Biochem* 149 (2010) 241-51.
- Otera, H. and Mihara, K.: Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission

- GTPase Drp1. *Small Gtpases* 2 (2011) 167-172.
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J. and Mihara, K.: Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191 (2010) 1141-58.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W. and Shaw, J.M.: The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* 143 (1998) 333-49.
- Ott, C., Ross, K., Straub, S., Thiede, B., Gotz, M., Goosmann, C., Krischke, M., Mueller, M.J., Krohne, G., Rudel, T. and Kozjak-Pavlovic, V.: Sam50 functions in mitochondrial intermembrane space bridging and biogenesis of respiratory complexes. *Mol Cell Biol* (2012).
- Paganoni, S., Bernstein, J. and Ferreira, A.: Ror1-Ror2 complexes modulate synapse formation in hippocampal neurons. *Neuroscience* 165 (2010) 1261-74.
- Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K., Hill, D.E., Vidal, M., Evans, J.G., Thorburn, D.R., Carr, S.A. and Mootha, V.K.: A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134 (2008) 112-23.
- Pakan, J.M. and Wylie, D.R.: Congruence of zebrin II expression and functional zones defined by climbing fiber topography in the flocculus. *Neuroscience* 157 (2008) 57-69.
- Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J. and Shen, J.: Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 279 (2004) 18614-22.
- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E. and Ryan, M.T.: MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* 12 (2011a) 565-73.
- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Stojanovski, D. and Ryan, M.T.: The regulation of mitochondrial morphology: Intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal* (2011b).
- Panhuysen, M., Vogt Weisenhorn, D.M., Blanquet, V., Brodski, C., Heinzmann, U., Beisker, W. and Wurst, W.: Effects of Wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region. *Mol Cell Neurosci* 26 (2004) 101-11.
- Papkoff, J. and Aikawa, M.: WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247 (1998) 851-8.
- Park, M., Wu, X., Golden, K., Axelrod, J.D. and Bodmer, R.: The wingless signaling pathway is directly involved in *Drosophila* heart development. *Dev Biol* 177 (1996) 104-16.
- Park, Y.U., Jeong, J., Lee, H., Mun, J.Y., Kim, J.H., Lee, J.S., Nguyen, M.D., Han, S.S., Suh, P.G. and Park, S.K.: Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) plays essential roles in mitochondria in collaboration with Mitofilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010a) 17785-90.
- Park, Y.Y., Lee, S., Karbowski, M., Neutzner, A., Youle, R.J. and Cho, H.: Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J Cell Sci* 123 (2010b) 619-26.
- Parone, P.A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D.I., Maechler, P., Barja, F. and Martinou, J.C.: Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* 3 (2008) e3257.
- Parr, B.A., Shea, M.J., Vassileva, G. and McMahon, A.P.: Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* 119 (1993) 247-61.

- Patapoutian, A. and Reichardt, L.F.: Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* 10 (2000) 392-9.
- Pathak, D., Sepp, K.J. and Hollenbeck, P.J.: Evidence that myosin activity opposes microtubule-based axonal transport of mitochondria. *J Neurosci* 30 (2010) 8984-92.
- Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M.E. and Palau, F.: GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 14 (2005) 1087-94.
- Peifer, M., Berg, S. and Reynolds, A.B.: A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76 (1994) 789-91.
- Peifer, M., Rauskolb, C., Williams, M., Riggleman, B. and Wieschaus, E.: The segment polarity gene armadillo interacts with the wingless signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation. *Development* 111 (1991) 1029-43.
- Pellegrini, L. and Scorrano, L.: A cut short to death: Parl and Opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. *Cell Death Differ* 14 (2007) 1275-84.
- Perrot, R. and Julien, J.P.: Real-time imaging reveals defects of fast axonal transport induced by disorganization of intermediate filaments. *Faseb J* 23 (2009) 3213-25.
- Pilling, A.D., Horiuchi, D., Lively, C.M. and Saxton, W.M.: Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Mol Biol Cell* 17 (2006) 2057-68.
- Pinson, K.I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B.J. and Skarnes, W.C.: An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407 (2000) 535-8.
- Piton, A., Gauthier, J., Hamdan, F.F., Lafreniere, R.G., Yang, Y., Henrion, E., Laurent, S., Noreau, A., Thibodeau, P., Karemera, L., Spiegelman, D., Kuku, F., Duguay, J., Destroismaisons, L., Jolivet, P., Cote, M., Lachapelle, K., Diallo, O., Raymond, A., Marineau, C., Champagne, N., Xiong, L., Gaspar, C., Riviere, J.B., Tarabeux, J., Cossette, P., Krebs, M.O., Rapoport, J.L., Addington, A., Delisi, L.E., Mottron, L., Joover, R., Fombonne, E., Drapeau, P. and Rouleau, G.A.: Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* (2010).
- Pitts, K.R., Yoon, Y., Krueger, E.W. and McNiven, M.A.: The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 10 (1999) 4403-17.
- Playford, M.P., Bicknell, D., Bodmer, W.F. and Macaulay, V.M.: Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 12103-8.
- Polakis, P.: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14 (2000) 1837-51.
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Andrews, L.A., McBride, H.M., Whitworth, A.J. and Pallanck, L.J.: The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 1638-43.
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Yu, S., Vincow, E.S. and Pallanck, L.: The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS One* 5 (2010) e10054.
- Popperl, H., Schmidt, C., Wilson, V., Hume, C.R., Dodd, J., Krumlauf, R. and Beddington, R.S.: Misexpression of *Cwnt8C* in the mouse induces an ectopic embryonic axis and causes a truncation of the anterior neuroectoderm. *Development* 124 (1997) 2997-3005.
- Prud'homme, B., Lartillot, N., Balavoine, G., Adoutte, A. and Vervoort, M.: Phylogenetic analysis of the Wnt gene family. Insights from lophotrochozoan members. *Curr Biol* 12 (2002) 1395.
- Puelles, L.: Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain Res Bull* 55

- (2001) 695-710.
- Purro, S.A., Ciani, L., Hoyos-Flight, M., Stamatakou, E., Siomou, E. and Salinas, P.C.: Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. *J Neurosci* 28 (2008) 8644-54.
- Quintero, O.A., DiVito, M.M., Adikes, R.C., Kortan, M.B., Case, L.B., Lier, A.J., Panaretos, N.S., Slater, S.Q., Rengarajan, M., Feliu, M. and Cheney, R.E.: Human Myo19 is a novel myosin that associates with mitochondria. *Curr Biol* 19 (2009) 2008-13.
- Rapaport, D.: Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep* 4 (2003) 948-52.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. and Westermann, B.: Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273 (1998) 20150-5.
- Rappaport, L., Oliviero, P. and Samuel, J.L.: Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function. *Mol Cell Biochem* 184 (1998) 101-5.
- Ratcliffe, M.J., Itoh, K. and Sokol, S.Y.: A positive role for the PP2A catalytic subunit in Wnt signal transduction. *J Biol Chem* 275 (2000) 35680-3.
- Rawal, N., Corti, O., Sacchetti, P., Ardilla-Osorio, H., Sehat, B., Brice, A. and Arenas, E.: Parkin protects dopaminergic neurons from excessive Wnt/beta-catenin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 388 (2009) 473-8.
- Reddy, P.H., Reddy, T.P., Manczak, M., Calkins, M.J., Shirendeb, U. and Mao, P.: Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 67 (2011) 103-18.
- Reis, K., Fransson, A. and Aspenstrom, P.: The Miro GTPases: at the heart of the mitochondrial transport machinery. *FEBS Lett* 583 (2009) 1391-8.
- Reynolds, I.J. and Rintoul, G.L.: Mitochondrial stop and go: signals that regulate organelle movement. *Sci STKE* 2004 (2004) PE46.
- Rice, D.S. and Curran, T.: Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24 (2001) 1005-39.
- Rickman, D.S., Millon, R., De Reynies, A., Thomas, E., Wasylyk, C., Muller, D., Abecassis, J. and Wasylyk, B.: Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene* 27 (2008) 6607-22.
- Rintoul, G.L., Filiano, A.J., Brocard, J.B., Kress, G.J. and Reynolds, I.J.: Glutamate decreases mitochondrial size and movement in primary forebrain neurons. *J Neurosci* 23 (2003) 7881-8.
- Rintoul, G.L. and Reynolds, I.J.: Mitochondrial trafficking and morphology in neuronal injury. *Biochim Biophys Acta* 1802 (2010) 143-50.
- Ritter, S.L. and Hall, R.A.: Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (2009) 819-30.
- Rizzuto, R.: Intracellular Ca(2+) pools in neuronal signalling. *Curr Opin Neurobiol* 11 (2001) 306-11.
- Rizzuto, R., Bernardi, P. and Pozzan, T.: Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 529 Pt 1 (2000) 37-47.
- Rodova, M., Islam, M.R., Maser, R.L. and Calvet, J.P.: The polycystic kidney disease-1 promoter is a target of the beta-catenin/T-cell factor pathway. *J Biol Chem* 277 (2002) 29577-83.
- Rohrbeck, A. and Borlak, J.: Cancer genomics identifies regulatory gene networks associated with the transition from dysplasia to advanced lung adenocarcinomas induced by c-Raf-1. *PLoS One* 4 (2009) e7315.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. and Lombes, A.: Membrane topology and mitochondrial

- targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115 (2002) 1663-74.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O. and Clevers, H.: The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395 (1998) 608-12.
- Rosales-Reynoso, M.A., Ochoa-Hernandez, A.B., Aguilar-Lemarroy, A., Jave-Suarez, L.F., Troyo-Sanroman, R. and Barros-Nunez, P.: Gene expression profiling identifies WNT7A as a possible candidate gene for decreased cancer risk in fragile X syndrome patients. *Arch Med Res* 41 (2010) 110-118 e2.
- Rosso, S.B., Sussman, D., Wynshaw-Boris, A. and Salinas, P.C.: Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat Neurosci* 8 (2005) 34-42.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. and De Camilli, P.: GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441 (2006) 528-31.
- Rui, Y., Tiwari, P., Xie, Z. and Zheng, J.Q.: Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons. *J Neurosci* 26 (2006) 10480-7.
- Russo, G.J., Louie, K., Wellington, A., Macleod, G.T., Hu, F., Panchumarthi, S. and Zinsmaier, K.E.: *Drosophila* Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport. *J Neurosci* 29 (2009) 5443-55.
- Ruthel, G. and Hollenbeck, P.J.: Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth. *J Neurosci* 23 (2003) 8618-24.
- Sack, G.H., Jr.: Mitochondrial matters in Huntington disease. *J Bioenerg Biomembr* 42 (2010) 189-91.
- Sadot, E., Simcha, I., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A. and Geiger, B.: Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 15339-44.
- Sahores, M., Gibb, A. and Salinas, P.C.: Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis. *Development* 137 (2010) 2215-25.
- Salinas, P.C.: Wnt factors in axonal remodelling and synaptogenesis. *Biochem Soc Symp* 65 (1999) 101-9.
- Salinas, P.C.: Retrograde signalling at the synapse: a role for Wnt proteins. *Biochem Soc Trans* 33 (2005) 1295-8.
- Salinas, P.C.: Modulation of the microtubule cytoskeleton: a role for a divergent canonical Wnt pathway. *Trends Cell Biol* 17 (2007) 333-42.
- Salinas, P.C. and Zou, Y.: Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu Rev Neurosci* 31 (2008) 339-58.
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C. and Cossarizza, A.: JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* 411 (1997) 77-82.
- Samarzija, I., Sini, P., Schlange, T., Macdonald, G. and Hynes, N.E.: Wnt3a regulates proliferation and migration of HUVEC via canonical and non-canonical Wnt signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 386 (2009) 449-54.
- Sandebring, A., Thomas, K.J., Beilina, A., van der Brug, M., Cleland, M.M., Ahmad, R., Miller, D.W., Zambrano, I., Cowburn, R.F., Behbahani, H., Cedazo-Minguez, A. and Cookson, M.R.: Mitochondrial alterations in PINK1 deficient cells are influenced by calcineurin-dependent dephosphorylation of dynamin-related protein 1. *PLoS One* 4 (2009) e5701.
- Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y. and Mikoshiba, K.: The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* 417 (2002) 295-9.

- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R.J. and Fuller, M.T.: Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116 (2003) 2763-74.
- Santel, A. and Fuller, M.T.: Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 114 (2001) 867-74.
- Santos, A., Bakker, A.D., de Blicke-Hogervorst, J.M. and Klein-Nulend, J.: WNT5A induces osteogenic differentiation of human adipose stem cells via rho-associated kinase ROCK. *Cytotherapy* 12 (2010a) 924-32.
- Santos, R.X., Correia, S.C., Wang, X., Perry, G., Smith, M.A., Moreira, P.I. and Zhu, X.: Alzheimer's disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning. *Int J Clin Exp Pathol* 3 (2010b) 570-81.
- Saotome, M., Safiulina, D., Szabadkai, G., Das, S., Fransson, A., Aspenstrom, P., Rizzuto, R. and Hajnoczky, G.: Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 20728-33.
- Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H. and Kikuchi, A.: Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *Embo J* 29 (2010) 41-54.
- Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y. and Endo, H.: Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 300 (2003) 482-93.
- Sawamura, N., Ando, T., Maruyama, Y., Fujimuro, M., Mochizuki, H., Honjo, K., Shimoda, M., Toda, H., Sawamura-Yamamoto, T., Makuch, L.A., Hayashi, A., Ishizuka, K., Cascella, N.G., Kamiya, A., Ishida, N., Tomoda, T., Hai, T., Furukubo-Tokunaga, K. and Sawa, A.: Nuclear DISC1 regulates CRE-mediated gene transcription and sleep homeostasis in the fruit fly. *Mol Psychiatry* 13 (2008) 1138-48, 1069.
- Schambony, A. and Wedlich, D.: Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* 12 (2007) 779-92.
- Schapira, A.H.: Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 7 (2008) 97-109.
- Schlessinger, K., McManus, E.J. and Hall, A.: Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J Cell Biol* 178 (2007) 355-61.
- Schmitt, A.M., Shi, J., Wolf, A.M., Lu, C.C., King, L.A. and Zou, Y.: Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* 439 (2006) 31-7.
- Schon, E.A. and Przedborski, S.: Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* 70 (2011) 1033-53.
- Schulte, G. and Bryja, V.: The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28 (2007) 518-25.
- Schwamborn, J.C. and Puschel, A.W.: The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* 7 (2004) 923-9.
- Schwarzer, C., Barnikol-Watanabe, S., Thinner, F.P. and Hilschmann, N.: Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol* 34 (2002) 1059-70.
- Selkoe, D.J.: Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298 (2002) 789-91.
- Selvadurai, H.J. and Mason, J.O.: Wnt/beta-catenin signalling is active in a highly dynamic pattern during development of the mouse cerebellum. *PLoS One* 6 (2011) e23012.
- Semenov, M.V., Habas, R., Macdonald, B.T. and He, X.: SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* 131 (2007) 1378.
- Sesaki, H. and Jensen, R.E.: UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 152 (2001) 1123-34.
- Sheldahl, L.C., Park, M., Malbon, C.C. and Moon, R.T.: Protein kinase C is differentially

- stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 9 (1999) 695-8.
- Sheldahl, L.C., Slusarski, D.C., Pandur, P., Miller, J.R., Kuhl, M. and Moon, R.T.: Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol* 161 (2003) 769-77.
- Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S.P. and Martin, S.J.: Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell* 31 (2008) 570-85.
- Shi, S.H., Cheng, T., Jan, L.Y. and Jan, Y.N.: APC and GSK-3 β are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol* 14 (2004) 2025-32.
- Shi, S.H., Jan, L.Y. and Jan, Y.N.: Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112 (2003) 63-75.
- Shimizu, H., Julius, M.A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A.M. and Kitajewski, J.: Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* 8 (1997) 1349-58.
- Shirendeb, U., Reddy, A.P., Manczak, M., Calkins, M.J., Mao, P., Tagle, D.A. and Reddy, P.H.: Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20 (2011) 1438-55.
- Shy, M.E.: Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr Opin Neurol* 17 (2004) 579-85.
- Siegfried, E., Wilder, E.L. and Perrimon, N.: Components of wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* 367 (1994) 76-80.
- Simcha, I., Shtutman, M., Salomon, D., Zhurinsky, J., Sadot, E., Geiger, B. and Ben-Ze'ev, A.: Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *J Cell Biol* 141 (1998) 1433-48.
- Simonin, F., Karcher, P., Boeuf, J.J., Matifas, A. and Kieffer, B.L.: Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J Neurochem* 89 (2004) 766-75.
- Singaravelu, K., Nelson, C., Bakowski, D., de Brito, O.M., Ng, S.W., Di Capite, J., Powell, T., Scorrano, L. and Parekh, A.B.: Mitofusin 2 regulates STIM1 migration from the Ca²⁺ store to the plasma membrane in cells with depolarized mitochondria. *J Biol Chem* 286 (2011) 12189-201.
- Skulachev, V.P.: Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* 26 (2001) 23-9.
- Slusarski, D.C., Corces, V.G. and Moon, R.T.: Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390 (1997a) 410-3.
- Slusarski, D.C., Yang-Snyder, J., Busa, W.B. and Moon, R.T.: Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* 182 (1997b) 114-20.
- Smalley, M.J. and Dale, T.C.: Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18 (1999) 215-30.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L. and van der Bliek, A.M.: Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12 (2001) 2245-56.
- Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S.N. and van der Bliek, A.M.: A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 143 (1998) 351-8.
- Smith, C.A., McClive, P.J. and Sinclair, A.H.: Temporal and spatial expression profile of the novel armadillo-related gene, Alex2, during testicular differentiation in the mouse embryo. *Dev Dyn* 233 (2005) 188-93.
- Smith, M.J., Pozo, K., Brickley, K. and Stephenson, F.A.: Mapping the GRIF-1 binding domain of the kinesin, KIF5C, substantiates a role for GRIF-1 as an adaptor protein in

- the anterograde trafficking of cargoes. *J Biol Chem* 281 (2006) 27216-28.
- Smith, W.C. and Harland, R.M.: Injected Xwnt-8 RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell* 67 (1991) 753-65.
- Sokol, S., Christian, J.L., Moon, R.T. and Melton, D.A.: Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos. *Cell* 67 (1991) 741-52.
- Sokol, S.Y., Klingensmith, J., Perrimon, N. and Itoh, K.: Dorsalizing and neuralizing properties of Xdsh, a maternally expressed *Xenopus* homolog of dishevelled. *Development* 121 (1995) 1637-47.
- Song, D.H., Dominguez, I., Mizuno, J., Kaut, M., Mohr, S.C. and Seldin, D.C.: CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling. *J Biol Chem* 278 (2003) 24018-25.
- Song, D.H., Sussman, D.J. and Seldin, D.C.: Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 275 (2000) 23790-7.
- Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., Poquiz, P., Tjong, J., Pouladi, M.A., Hayden, M.R., Masliah, E., Ellisman, M., Rouiller, I., Schwarzenbacher, R., Bossy, B., Perkins, G. and Bossy-Wetzel, E.: Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat Med* 17 (2011) 377-82.
- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. and Chan, D.C.: OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* 178 (2007) 749-55.
- Speese, S.D. and Budnik, V.: Wnts: up-and-coming at the synapse. *Trends Neurosci* 30 (2007) 268-75.
- Spinazzi, M., Cazzola, S., Bortolozzi, M., Baracca, A., Loro, E., Casarin, A., Solaini, G., Sgarbi, G., Casalena, G., Cenacchi, G., Malena, A., Frezza, C., Carrara, F., Angelini, C., Scorrano, L., Salviati, L. and Vergani, L.: A novel deletion in the GTPase domain of OPA1 causes defects in mitochondrial morphology and distribution, but not in function. *Hum Mol Genet* 17 (2008) 3291-302.
- Spinsanti, P., De Vita, T., Caruso, A., Melchiorri, D., Misasi, R., Caricasole, A. and Nicoletti, F.: Differential activation of the calcium/protein kinase C and the canonical beta-catenin pathway by Wnt1 and Wnt7a produces opposite effects on cell proliferation in PC12 cells. *J Neurochem* 104 (2008) 1588-98.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G. and McMahon, A.P.: Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372 (1994) 679-83.
- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F.H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., Timm, J., Mintzlaff, S., Abraham, C., Bock, N., Kietzmann, S., Goedde, A., Toksoz, E., Droege, A., Krobitsch, S., Korn, B., Birchmeier, W., Lehrach, H. and Wanker, E.E.: A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* 122 (2005) 957-68.
- Stojanovski, D., Koutsopoulos, O.S., Okamoto, K. and Ryan, M.T.: Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci* 117 (2004) 1201-10.
- Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Bruschi, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S. and Goldstein, L.S.: Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307 (2005) 1282-8.
- Stoothoff, W.H. and Johnson, G.V.: Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* 1739 (2005) 280-97.
- Stowers, R.S., Megeath, L.J., Gorska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I.A. and Schwarz, T.L.: Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel *Drosophila*

- protein. *Neuron* 36 (2002) 1063-77.
- Su, Y., Fu, C., Ishikawa, S., Stella, A., Kojima, M., Shitoh, K., Schreiber, E.M., Day, B.W. and Liu, B.: APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol Cell* 32 (2008) 652-61.
- Suen, D.F., Narendra, D.P., Tanaka, A., Manfredi, G. and Youle, R.J.: Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 11835-40.
- Sumanas, S. and Ekker, S.C.: *Xenopus frizzled-7* morphant displays defects in dorsoventral patterning and convergent extension movements during gastrulation. *Genesis* 30 (2001) 119-22.
- Sumanas, S., Strege, P., Heasman, J. and Ekker, S.C.: The putative wnt receptor *Xenopus frizzled-7* functions upstream of beta-catenin in vertebrate dorsoventral mesoderm patterning. *Development* 127 (2000) 1981-90.
- Sun, K.H., de Pablo, Y., Vincent, F. and Shah, K.: Deregulated Cdk5 promotes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J Neurochem* 107 (2008) 265-78.
- Super, H., Del Rio, J.A., Martinez, A., Perez-Sust, P. and Soriano, E.: Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. *Cereb Cortex* 10 (2000) 602-13.
- Sussman, D.J., Klingensmith, J., Salinas, P., Adams, P.S., Nusse, R. and Perrimon, N.: Isolation and characterization of a mouse homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled*. *Dev Biol* 166 (1994) 73-86.
- Suwanwela, J., Farber, C.R., Haung, B.L., Song, B., Pan, C., Lyons, K.M. and Lusic, A.J.: Systems genetics analysis of mouse chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res* (2010).
- Suzuki, A., Hirata, M., Kamimura, K., Maniwa, R., Yamanaka, T., Mizuno, K., Kishikawa, M., Hirose, H., Amano, Y., Izumi, N., Miwa, Y. and Ohno, S.: aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol* 14 (2004) 1425-35.
- Suzuki, M., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Youle, R.J. and Tjandra, N.: The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J Mol Biol* 334 (2003) 445-58.
- Suzuki, M., Neutzner, A., Tjandra, N. and Youle, R.J.: Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 280 (2005) 21444-52.
- Tada, M. and Smith, J.C.: *Xwnt11* is a target of *Xenopus* Brachyury: regulation of gastrulation movements via Dishevelled, but not through the canonical Wnt pathway. *Development* 127 (2000) 2227-38.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T. and Mihara, K.: Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282 (2007) 11521-9.
- Tahinci, E., Thorne, C.A., Franklin, J.L., Salic, A., Christian, K.M., Lee, L.A., Coffey, R.J. and Lee, E.: Lrp6 is required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Development* 134 (2007) 4095-106.
- Takada, R., Hijikata, H., Kondoh, H. and Takada, S.: Analysis of combinatorial effects of Wnts and Frizzleds on beta-catenin/armadillo stabilization and Dishevelled phosphorylation. *Genes Cells* 10 (2005) 919-28.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P. and He, X.: LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407 (2000) 530-5.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z. and He, X.: A mechanism for

- Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 13 (2004) 149-56.
- Tamura, Y., Itoh, K. and Sesaki, H.: SnapShot: Mitochondrial Dynamics. *Cell* 145 (2011) 1158-1158 e1.
- Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.F., Karbowski, M. and Youle, R.J.: Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* 191 (2010) 1367-80.
- Tanaka, K., Sugiura, Y., Ichishita, R., Mihara, K. and Oka, T.: KLP6: a newly identified kinesin that regulates the morphology and transport of mitochondria in neuronal cells. *J Cell Sci* 124 (2011) 2457-65.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A. and Hirokawa, N.: Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 93 (1998) 1147-58.
- Tao, Q., Yokota, C., Puck, H., Kofron, M., Birsoy, B., Yan, D., Asashima, M., Wylie, C.C., Lin, X. and Heasman, J.: Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 120 (2005) 857-71.
- Tappe-Theodor, A., Agarwal, N., Katona, I., Rubino, T., Martini, L., Swiercz, J., Mackie, K., Monyer, H., Parolaro, D., Whistler, J., Kuner, T. and Kuner, R.: A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *J Neurosci* 27 (2007) 4165-77.
- Tatsuta, T. and Langer, T.: Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *Embo J* 27 (2008) 306-14.
- Taya, S., Shinoda, T., Tsuboi, D., Asaki, J., Nagai, K., Hikita, T., Kuroda, S., Kuroda, K., Shimizu, M., Hirotsune, S., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K.: DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1. *J Neurosci* 27 (2007) 15-26.
- Terabayashi, T., Itoh, T.J., Yamaguchi, H., Yoshimura, Y., Funato, Y., Ohno, S. and Miki, H.: Polarity-regulating kinase partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinase 2 negatively regulates development of dendrites on hippocampal neurons. *J Neurosci* 27 (2007) 13098-107.
- Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K.A. and Coates, J.C.: Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol* 20 (2010) 470-81.
- Thomas, K.J. and Cookson, M.R.: The role of PTEN-induced kinase 1 in mitochondrial dysfunction and dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (2009) 2025-35.
- Thomas, K.R. and Capecchi, M.R.: Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* 346 (1990) 847-50.
- Thompson, D., Martini, L. and Whistler, J.L.: Altered ratio of D1 and D2 dopamine receptors in mouse striatum is associated with behavioral sensitization to cocaine. *PLoS One* 5 (2010) e11038.
- Thompson, D., Pusch, M. and Whistler, J.L.: Changes in G protein-coupled receptor sorting protein affinity regulate postendocytic targeting of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 282 (2007) 29178-85.
- Thompson, D. and Whistler, J.L.: Dopamine D(3) receptors are down-regulated following heterologous endocytosis by a specific interaction with G protein-coupled receptor-associated sorting protein-1. *J Biol Chem* 286 (2011) 1598-608.
- Titus, M.A.: Motors: unleashing mitochondria. *Curr Biol* 19 (2009) R1076-8.
- Tolkovsky, A.M., Xue, L., Fletcher, G.C. and Borutaite, V.: Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie* 84 (2002) 233-40.
- Tolwinski, N.S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., DiNardo, S. and Wieschaus, E.: Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of

- Zw3/Gsk3beta activity. *Dev Cell* 4 (2003) 407-18.
- Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J. and Santel, A.: The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Sci* 118 (2005) 3049-59.
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., Ehses, S., Krause, F., Chan, D.C., Alexander, C., Bauer, C., Youle, R., Langer, T. and Martinou, J.C.: SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *Embo J* 28 (2009) 1589-600.
- Toomes, C., Marchbank, N.J., Mackey, D.A., Craig, J.E., Newbury-Ecob, R.A., Bennett, C.P., Vize, C.J., Desai, S.P., Black, G.C., Patel, N., Teimory, M., Markham, A.F., Inglehearn, C.F. and Churchill, A.J.: Spectrum, frequency and penetrance of OPA1 mutations in dominant optic atrophy. *Hum Mol Genet* 10 (2001) 1369-78.
- Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J. and Yang, Y.: Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 162 (2003) 899-908.
- Torres, M.A., Yang-Snyder, J.A., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., McGrew, L.L. and Moon, R.T.: Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* 133 (1996) 1123-37.
- Tree, D.R., Ma, D. and Axelrod, J.D.: A three-tiered mechanism for regulation of planar cell polarity. *Semin Cell Dev Biol* 13 (2002) 217-24.
- Trivedi, N., Marsh, P., Goold, R.G., Wood-Kaczmar, A. and Gordon-Weeks, P.R.: Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J Cell Sci* 118 (2005) 993-1005.
- Trushina, E., Dyer, R.B., Badger, J.D., 2nd, Ure, D., Eide, L., Tran, D.D., Vrieze, B.T., Legendre-Guillemain, V., McPherson, P.S., Mandavilli, B.S., Van Houten, B., Zeitlin, S., McNiven, M., Aebersold, R., Hayden, M., Parisi, J.E., Seeberg, E., Dragatsis, I., Doyle, K., Bender, A., Chacko, C. and McMurray, C.T.: Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 8195-209.
- Tsai, I.C., Amack, J.D., Gao, Z.H., Band, V., Yost, H.J. and Virshup, D.M.: A Wnt-CKI/varepsilon-Rap1 pathway regulates gastrulation by modulating SIPA1L1, a Rap GTPase activating protein. *Dev Cell* 12 (2007) 335-47.
- Tsai, L.H., Lee, M.S. and Cruz, J.: Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta* 1697 (2004) 137-42.
- Tschische, P., Moser, E., Thompson, D., Vischer, H.F., Parzmair, G.P., Pommer, V., Platzner, W., Schwarzbraun, T., Schaidler, H., Smit, M.J., Martini, L., Whistler, J.L. and Waldhoer, M.: The G-protein coupled receptor associated sorting protein GASP-1 regulates the signalling and trafficking of the viral chemokine receptor US28. *Traffic* 11 (2010) 660-74.
- Tuszynski, G.P., Rothman, V.L., Zheng, X., Gutu, M., Zhang, X. and Chang, F.: G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1 (GASP-1), a potential biomarker in breast cancer. *Exp Mol Pathol* 91 (2011) 608-13.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E. and Shirihai, O.S.: Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J* 27 (2008) 433-46.
- Ulloa, F. and Briscoe, J.: Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell Cycle* 6 (2007) 2640-9.
- Ulloa, F. and Marti, E.: Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-

- ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Dev Dyn* 239 (2010) 69-76.
- Usui, H., Falk, J.D., Dopazo, A., de Lecea, L., Erlander, M.G. and Sutcliffe, J.G.: Isolation of clones of rat striatum-specific mRNAs by directional tag PCR subtraction. *J Neurosci* 14 (1994) 4915-26.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G. and Wood, N.W.: Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304 (2004) 1158-60.
- van Amerongen, R. and Nusse, R.: Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136 (2009) 3205-14.
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, M., Mortin, M. and Clevers, H.: Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88 (1997) 789-99.
- van Gijn, M.E., Blankesteyn, W.M., Smits, J.F., Hierck, B. and Gittenberger-de Groot, A.C.: Frizzled 2 is transiently expressed in neural crest-containing areas during development of the heart and great arteries in the mouse. *Anat Embryol (Berl)* 203 (2001) 185-92.
- Van Laar, V.S. and Berman, S.B.: Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 218 (2009) 247-56.
- Varadi, A., Johnson-Cadwell, L.I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V.J. and Rutter, G.A.: Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci* 117 (2004) 4389-400.
- Varela-Nallar, L., Alfaro, I.E., Serrano, F.G., Parodi, J. and Inestrosa, N.C.: Wingless-type family member 5A (Wnt-5a) stimulates synaptic differentiation and function of glutamatergic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 21164-9.
- Varela-Nallar, L., Grabowski, C.P., Alfaro, I.E., Alvarez, A.R. and Inestrosa, N.C.: Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function. *Neural Dev* 4 (2009) 41.
- Veeman, M.T., Axelrod, J.D. and Moon, R.T.: A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5 (2003a) 367-77.
- Veeman, M.T., Slusarski, D.C., Kaykas, A., Louie, S.H. and Moon, R.T.: Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* 13 (2003b) 680-5.
- Verburg, J. and Hollenbeck, P.J.: Mitochondrial membrane potential in axons increases with local nerve growth factor or semaphorin signaling. *J Neurosci* 28 (2008) 8306-15.
- Verhoeven, K., Claeys, K.G., Zuchner, S., Schroder, J.M., Weis, J., Ceuterick, C., Jordanova, A., Nelis, E., De Vriendt, E., Van Hul, M., Seeman, P., Mazanec, R., Saifi, G.M., Szigeti, K., Mancias, P., Butler, I.J., Kochanski, A., Ryniewicz, B., De Bleecker, J., Van den Bergh, P., Verellen, C., Van Coster, R., Goemans, N., Auer-Grumbach, M., Robberecht, W., Milic Rasic, V., Nevo, Y., Tournev, I., Guergueltcheva, V., Roelens, F., Vieregge, P., Vinci, P., Moreno, M.T., Christen, H.J., Shy, M.E., Lupski, J.R., Vance, J.M., De Jonghe, P. and Timmerman, V.: MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 129 (2006) 2093-102.
- Verkaar, F., van Rosmalen, J.W., Smits, J.F., Blankesteyn, W.M. and Zaman, G.J.: Stably overexpressed human Frizzled-2 signals through the beta-catenin pathway and does not activate Ca²⁺-mobilization in Human Embryonic Kidney 293 cells. *Cell Signal* 21 (2009) 22-33.

- Verkaar, F. and Zaman, G.J.: A model for signaling specificity of Wnt/Frizzled combinations through co-receptor recruitment. *FEBS Lett* 584 (2010) 3850-4.
- Verstreken, P., Ly, C.V., Venken, K.J., Koh, T.W., Zhou, Y. and Bellen, H.J.: Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47 (2005) 365-78.
- Vinson, C.R., Conover, S. and Adler, P.N.: A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* 338 (1989) 263-4.
- Vitureira, N., Andres, R., Perez-Martinez, E., Martinez, A., Bribian, A., Blasi, J., Chelliah, S., Lopez-Domenech, G., De Castro, F., Burgaya, F., McNagny, K. and Soriano, E.: Podocalyxin is a novel polysialylated neural adhesion protein with multiple roles in neural development and synapse formation. *PLoS One* 5 (2010) e12003.
- Vitureira, N., McNagny, K., Soriano, E. and Burgaya, F.: Pattern of expression of the podocalyxin gene in the mouse brain during development. *Gene Expr Patterns* 5 (2005) 349-54.
- Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R.L., Kim, J., May, J., Tocilescu, M.A., Liu, W., Ko, H.S., Magrane, J., Moore, D.J., Dawson, V.L., Grailhe, R., Dawson, T.M., Li, C., Tieu, K. and Przedborski, S.: PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 378-83.
- Votin, V., Nelson, W.J. and Barth, A.I.: Neurite outgrowth involves adenomatous polyposis coli protein and beta-catenin. *J Cell Sci* 118 (2005) 5699-708.
- Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M. and Sesaki, H.: The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol* 186 (2009) 805-16.
- Walker, F.O.: Huntington's disease. *Lancet* 369 (2007) 218-28.
- Wallace, D.C.: A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39 (2005) 359-407.
- Wang, H., Lee, Y. and Malbon, C.C.: PDE6 is an effector for the Wnt/Ca²⁺/cGMP-signalling pathway in development. *Biochem Soc Trans* 32 (2004) 792-6.
- Wang, H., Lim, P.J., Karbowski, M. and Monteiro, M.J.: Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Hum Mol Genet* 18 (2009a) 737-52.
- Wang, H., Song, P., Du, L., Tian, W., Yue, W., Liu, M., Li, D., Wang, B., Zhu, Y., Cao, C., Zhou, J. and Chen, Q.: Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J Biol Chem* 286 (2011a) 11649-58.
- Wang, H.Y., Liu, T. and Malbon, C.C.: Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal* 18 (2006) 934-41.
- Wang, H.Y. and Malbon, C.C.: Wnt signaling, Ca²⁺, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science* 300 (2003) 1529-30.
- Wang, H.Y. and Malbon, C.C.: Wnt-frizzled signaling to G-protein-coupled effectors. *Cell Mol Life Sci* 61 (2004) 69-75.
- Wang, X. and Schwarz, T.L.: The mechanism of Ca²⁺ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 136 (2009) 163-74.
- Wang, X., Su, B., Fujioka, H. and Zhu, X.: Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am J Pathol* 173 (2008a) 470-82.
- Wang, X., Su, B., Lee, H.G., Li, X., Perry, G., Smith, M.A. and Zhu, X.: Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29 (2009b) 9090-103.
- Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G. and Zhu, X.: Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via

- differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008b) 19318-23.
- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M.J. and Schwarz, T.L.: PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 147 (2011b) 893-906.
- Wang, Y., Macke, J.P., Abella, B.S., Andreasson, K., Worley, P., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Nathans, J.: A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene *frizzled*. *J Biol Chem* 271 (1996) 4468-76.
- Wang, Y., Thekdi, N., Smallwood, P.M., Macke, J.P. and Nathans, J.: Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS. *J Neurosci* 22 (2002) 8563-73.
- Wang, Z., Havasi, A., Gall, J.M., Mao, H., Schwartz, J.H. and Borkan, S.C.: Beta-catenin promotes survival of renal epithelial cells by inhibiting Bax. *J Am Soc Nephrol* 20 (2009c) 1919-28.
- Wasiak, S., Zunino, R. and McBride, H.M.: Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* 177 (2007) 439-50.
- Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W., Mooyer, P.A., Wanders, R.J. and Leonard, J.V.: A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* 356 (2007) 1736-41.
- Wayman, G.A., Impey, S., Marks, D., Saneyoshi, T., Grant, W.F., Derkach, V. and Soderling, T.R.: Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of *Wnt-2*. *Neuron* 50 (2006) 897-909.
- Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A. and DiNardo, S.: *arrow* encodes an LDL-receptor-related protein essential for *Wingless* signalling. *Nature* 407 (2000) 527-30.
- Weidinger, G. and Moon, R.T.: When Wnts antagonize Wnts. *J Cell Biol* 162 (2003) 753-5.
- Weihofen, A., Thomas, K.J., Ostaszewski, B.L., Cookson, M.R. and Selkoe, D.J.: Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* 48 (2009) 2045-52.
- Weitzman, J.B.: Dishevelled nuclear shuttling. *J Biol* 4 (2005) 1.
- Westermann, B.: Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J Biol Chem* 283 (2008) 13501-5.
- Westermann, B.: Mitochondrial dynamics in model organisms: what yeasts, worms and flies have taught us about fusion and fission of mitochondria. *Semin Cell Dev Biol* 21 (2010a) 542-9.
- Westermann, B.: Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2010b) 872-84.
- Weston, C.R. and Davis, R.J.: The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 12 (2002) 14-21.
- Wharton, K.A., Jr.: Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol* 253 (2003) 1-17.
- Wheeler, G.N. and Hoppler, S.: Two novel *Xenopus* frizzled genes expressed in developing heart and brain. *Mech Dev* 86 (1999) 203-7.
- Whistler, J.L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S.R. and Von Zastrow, M.: Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 297 (2002) 615-20.
- Whitworth, A.J. and Pallanck, L.J.: The PINK1/Parkin pathway: a mitochondrial quality control system? *J Bioenerg Biomembr* 41 (2009) 499-503.

- Wickner, W. and Schekman, R.: Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15 (2008) 658-64.
- Wilkinson, D.G., Bailes, J.A. and McMahon, A.P.: Expression of the proto-oncogene *int-1* is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo. *Cell* 50 (1987) 79-88.
- Winkel, A., Stricker, S., Tylzanowski, P., Seiffart, V., Mundlos, S., Gross, G. and Hoffmann, A.: Wnt-ligand-dependent interaction of TAK1 (TGF-beta-activated kinase-1) with the receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt-signalling. *Cell Signal* 20 (2008) 2134-44.
- Winklhofer, K.F. and Haass, C.: Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1802 (2010) 29-44.
- Winston, J.T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C.Y., Elledge, S.J. and Harper, J.W.: The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13 (1999) 270-83.
- Winter, E.E. and Ponting, C.P.: Mammalian BEX, WEX and GASP genes: coding and non-coding chimaerism sustained by gene conversion events. *BMC Evol Biol* 5 (2005) 54.
- Wodarz, A. and Nusse, R.: Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14 (1998) 59-88.
- Wolf, A.M., Lyuksyutova, A.I., Fenstermaker, A.G., Shafer, B., Lo, C.G. and Zou, Y.: Phosphatidylinositol-3-kinase-atypical protein kinase C signaling is required for Wnt attraction and anterior-posterior axon guidance. *J Neurosci* 28 (2008) 3456-67.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. and Nunnari, J.: The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* 151 (2000) 341-52.
- Wong, G.T., Gavin, B.J. and McMahon, A.P.: Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 14 (1994) 6278-86.
- Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., Yao, Z., Abramov, A.Y., Miljan, E.A., Keen, G., Stanyer, L., Hargreaves, I., Klupsch, K., Deas, E., Downward, J., Mansfield, L., Jat, P., Taylor, J., Heales, S., Duchen, M.R., Latchman, D., Tabrizi, S.J. and Wood, N.W.: PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One* 3 (2008) e2455.
- Woodhead, G.J., Mutch, C.A., Olson, E.C. and Chenn, A.: Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. *J Neurosci* 26 (2006) 12620-30.
- Wrobel, C.N., Mutch, C.A., Swaminathan, S., Taketo, M.M. and Chenn, A.: Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev Biol* 309 (2007) 285-97.
- Wu, J., Jenny, A., Mirkovic, I. and Mlodzik, M.: Frizzled-Dishevelled signaling specificity outcome can be modulated by Diego in *Drosophila*. *Mech Dev* 125 (2008a) 30-42.
- Wu, X., Tu, X., Joeng, K.S., Hilton, M.J., Williams, D.A. and Long, F.: Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133 (2008b) 340-53.
- Yaffe, M.P.: Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol* 1 (1999a) E149-50.
- Yaffe, M.P.: The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 283 (1999b) 1493-7.
- Yang, G.Y., Liang, B., Zhu, J. and Luo, Z.G.: Calpain activation by Wingless-type murine mammary tumor virus integration site family, member 5A (Wnt5a) promotes axonal growth. *J Biol Chem* 286 (2011) 6566-76.
- Yang, G.Y. and Luo, Z.G.: Implication of Wnt signaling in neuronal polarization. *Dev Neurobiol* (2010).
- Yang, Y., Ouyang, Y., Yang, L., Beal, M.F., McQuibban, A., Vogel, H. and Lu, B.: Pink1

- regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 7070-5.
- Yang, Z. and Klionsky, D.J.: Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12 (2010) 814-22.
- Yap, A.S., Brieher, W.M. and Gumbiner, B.M.: Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13 (1997) 119-46.
- Yi, M., Weaver, D. and Hajnoczky, G.: Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol* 167 (2004) 661-72.
- Yokota, Y., Kim, W.Y., Chen, Y., Wang, X., Stanco, A., Komuro, Y., Snider, W. and Anton, E.S.: The adenomatous polyposis coli protein is an essential regulator of radial glial polarity and construction of the cerebral cortex. *Neuron* 61 (2009) 42-56.
- Yokoyama, N. and Malbon, C.C.: Phosphoprotein phosphatase-2A docks to Dishevelled and counterregulates Wnt3a/beta-catenin signaling. *J Mol Signal* 2 (2007) 12.
- Yokoyama, N., Yin, D. and Malbon, C.C.: Abundance, complexation, and trafficking of Wnt/beta-catenin signaling elements in response to Wnt3a. *J Mol Signal* 2 (2007) 11.
- Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., Inatome, R. and Yanagi, S.: A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *Embo J* 25 (2006) 3618-26.
- Yoon, J.C., Ng, A., Kim, B.H., Bianco, A., Xavier, R.J. and Elledge, S.J.: Wnt signaling regulates mitochondrial physiology and insulin sensitivity. *Genes Dev* 24 (2010) 1507-18.
- Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J. and McNiven, M.A.: The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 5409-20.
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A. and Kaibuchi, K.: GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120 (2005) 137-49.
- Youle, R.J. and Narendra, D.P.: Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12 (2011) 9-14.
- Yu, J.M., Kim, J.H., Song, G.S. and Jung, J.S.: Increase in proliferation and differentiation of neural progenitor cells isolated from postnatal and adult mice brain by Wnt-3a and Wnt-5a. *Mol Cell Biochem* 288 (2006) 17-28.
- Yu, W., Sun, Y., Guo, S. and Lu, B.: The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. *Hum Mol Genet* 20 (2011) 3227-40.
- Yu, X. and Malenka, R.C.: Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci* 6 (2003) 1169-77.
- Yuan, Y., Niu, C.C., Deng, G., Li, Z.Q., Pan, J., Zhao, C., Yang, Z.L. and Si, W.K.: The Wnt5a/Ror2 noncanonical signaling pathway inhibits canonical Wnt signaling in K562 cells. *Int J Mol Med* 27 (2011) 63-9.
- Zechner, D., Fujita, Y., Hulsken, J., Muller, T., Walther, I., Taketo, M.M., Crenshaw, E.B., 3rd, Birchmeier, W. and Birchmeier, C.: beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol* 258 (2003) 406-18.
- Zechner, D., Muller, T., Wende, H., Walther, I., Taketo, M.M., Crenshaw, E.B., 3rd, Treier, M., Birchmeier, W. and Birchmeier, C.: Bmp and Wnt/beta-catenin signals control expression of the transcription factor Olig3 and the specification of spinal cord neurons. *Dev Biol* 303 (2007) 181-90.
- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J.,

- Doble, B., Woodgett, J., Wynshaw-Boris, A., Hsieh, J.C. and He, X.: Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135 (2008) 367-75.
- Zhang, C.L., Ho, P.L., Kintner, D.B., Sun, D. and Chiu, S.Y.: Activity-dependent regulation of mitochondrial motility by calcium and Na/K-ATPase at nodes of Ranvier of myelinated nerves. *J Neurosci* 30 (2010a) 3555-66.
- Zhang, J., Liu, W., Liu, J., Xiao, W., Liu, L., Jiang, C., Sun, X., Liu, P., Zhu, Y., Zhang, C. and Chen, Q.: G-protein beta2 subunit interacts with mitofusin 1 to regulate mitochondrial fusion. *Nat Commun* 1 (2010b) 101.
- Zhang, J., Woodhead, G.J., Swaminathan, S.K., Noles, S.R., McQuinn, E.R., Pisarek, A.J., Stocker, A.M., Mutch, C.A., Funatsu, N. and Chenn, A.: Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. *Dev Cell* 18 (2010c) 472-9.
- Zhang, X., Zhu, J., Yang, G.Y., Wang, Q.J., Qian, L., Chen, Y.M., Chen, F., Tao, Y., Hu, H.S., Wang, T. and Luo, Z.G.: Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nat Cell Biol* 9 (2007) 743-54.
- Zhang, Y. and Chan, D.C.: Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 18526-30.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., Saito, M., Tsuji, S., Hayashi, Y. and Hirokawa, N.: Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105 (2001) 587-97.
- Zhao, J., Liu, T., Jin, S., Wang, X., Qu, M., Uhlen, P., Tomilin, N., Shupliakov, O., Lendahl, U. and Nister, M.: Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *Embo J* 30 (2011) 2762-78.
- Zhou, C., Huang, Y., Shao, Y., May, J., Prou, D., Perier, C., Dauer, W., Schon, E.A. and Przedborski, S.: The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 12022-7.
- Zhou, C.J., Borello, U., Rubenstein, J.L. and Pleasure, S.J.: Neuronal production and precursor proliferation defects in the neocortex of mice with loss of function in the canonical Wnt signaling pathway. *Neuroscience* 142 (2006) 1119-31.
- Zhou, C.J., Pinson, K.I. and Pleasure, S.J.: Severe defects in dorsal thalamic development in low-density lipoprotein receptor-related protein-6 mutants. *J Neurosci* 24 (2004a) 7632-9.
- Zhou, C.J., Zhao, C. and Pleasure, S.J.: Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J Neurosci* 24 (2004b) 121-6.
- Zhou, X., Yang, G., Huang, R., Chen, X. and Hu, G.: SVH-B interacts directly with p53 and suppresses the transcriptional activity of p53. *FEBS Lett* 581 (2007) 4943-8.
- Zhu, S., Liu, L., Korzh, V., Gong, Z. and Low, B.C.: RhoA acts downstream of Wnt5 and Wnt11 to regulate convergence and extension movements by involving effectors Rho kinase and Diaphanous: use of zebrafish as an in vivo model for GTPase signaling. *Cell Signal* 18 (2006) 359-72.
- Ziviani, E., Tao, R.N. and Whitworth, A.J.: *Drosophila* parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 5018-23.
- Zorzano, A., Liesa, M., Sebastian, D., Segales, J. and Palacin, M.: Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 21 (2010) 566-74.
- Zou, Y.: Wnt signaling in axon guidance. *Trends Neurosci* 27 (2004) 528-32.

- Zuchner, S., De Jonghe, P., Jordanova, A., Claeys, K.G., Guergueltcheva, V., Cherninkova, S., Hamilton, S.R., Van Stavern, G., Krajewski, K.M., Stajich, J., Tournev, I., Verhoeven, K., Langerhorst, C.T., de Visser, M., Baas, F., Bird, T., Timmerman, V., Shy, M. and Vance, J.M.: Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol* 59 (2006) 276-81.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M. and Vance, J.M.: Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36 (2004) 449-51.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A.A. and Nathke, I.S.: Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol* 11 (2001) 44-9.
- Zunino, R., Braschi, E., Xu, L. and McBride, H.M.: Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP1-dependent fission during mitosis. *J Biol Chem* 284 (2009) 17783-95.
- Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M. and McBride, H.M.: The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci* 120 (2007) 1178-88.