

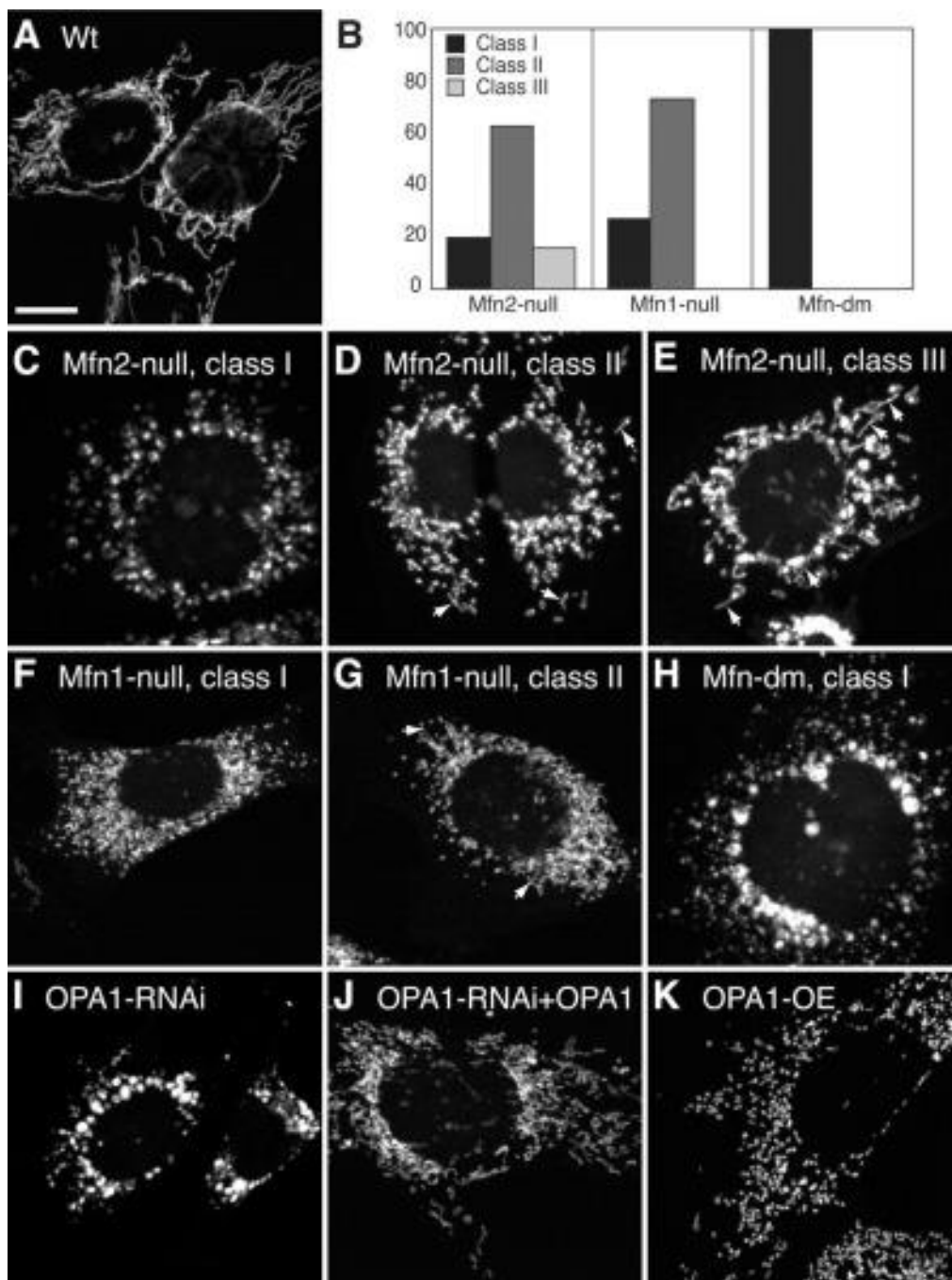


FIGURA 1

Morfología mitocondrial de fibroblastos humanos en cultivo. Las mitocondrias fueron marcadas con Su9-GFP (péptido señal de subunidad 9 de F₀-ATPasa fusionado a GFP) y se observan imágenes confocales. Condiciones: (A) células wild-type (salvaje, sin mutaciones), (C-E) Mfn2-null (sin expresión de Mfn2), (F-G) Mfn1-null (sin expresión de Mfn1), (H) Mfn-dm (doble mutante sin expresión de Mfn1 ni Mfn2), (I) OPA1-RNAi (expresión endógena de OPA1 reducida), (J) OPA1-RNAi + OPA1 (expresión endógena de OPA1 reducida y sobre-expresión de OPA1 exógena), (K) sobre-expresión de OPA1 exógena. (B) Gráfica con la clasificación de células en diferentes subtipos observados (200 células cuantificadas por genotipo). Escala: 10 μ m.

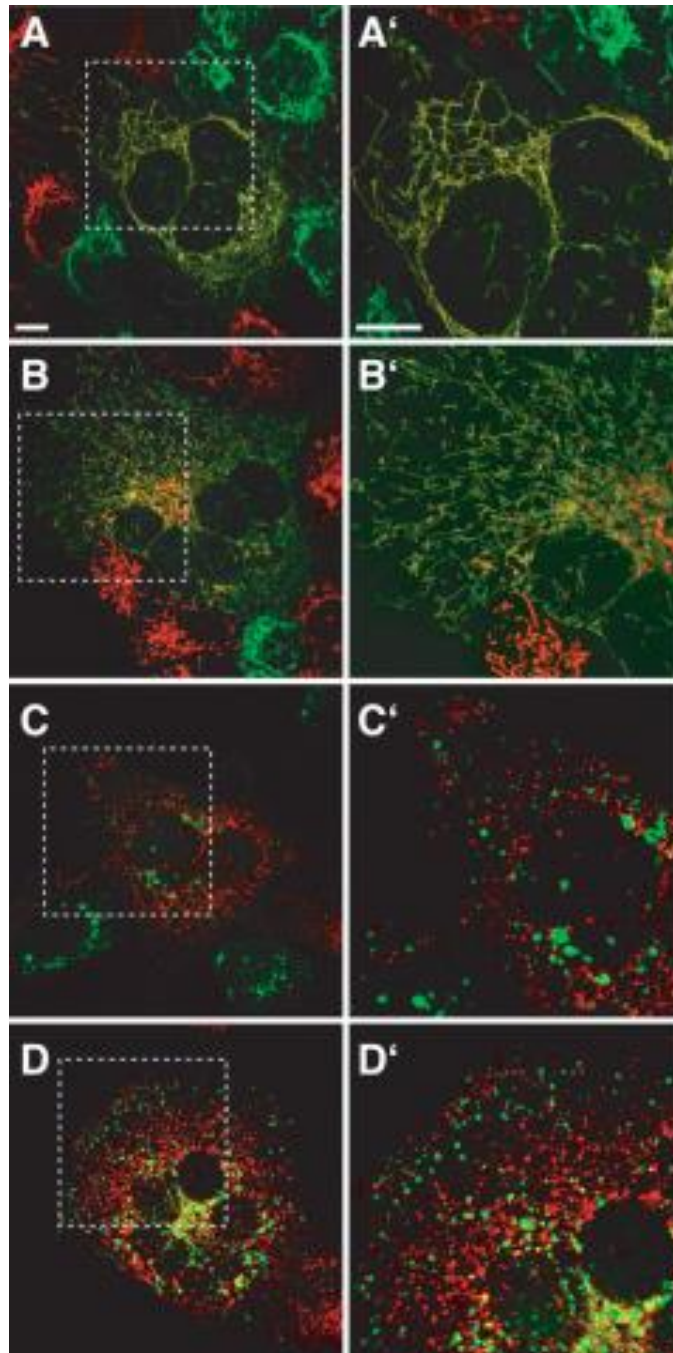


FIGURA 2

Ensayo de fusión mitocondrial a través de la fusión inducida de células mutantes. Se fusionaron células con mitocondrias marcadas con DsRed o GFP. Se formaron híbridos entre los siguientes tipos celulares: (A) wild-type y wild-type (células salvajes, sin mutaciones), (B) Mfn2-null (sin expresión de Mfn2) y Mfn1-null (sin expresión de Mfn1), (C) OPA1-RNAi y OPA1-RNAi (con expresión reducida de OPA1), (D) OPA1-RNAi (marcador de membrana mitocondrial externa en rojo) y OPA1-RNAi (con marcador de matriz mitocondrial en verde). Escala: 10 μ m.

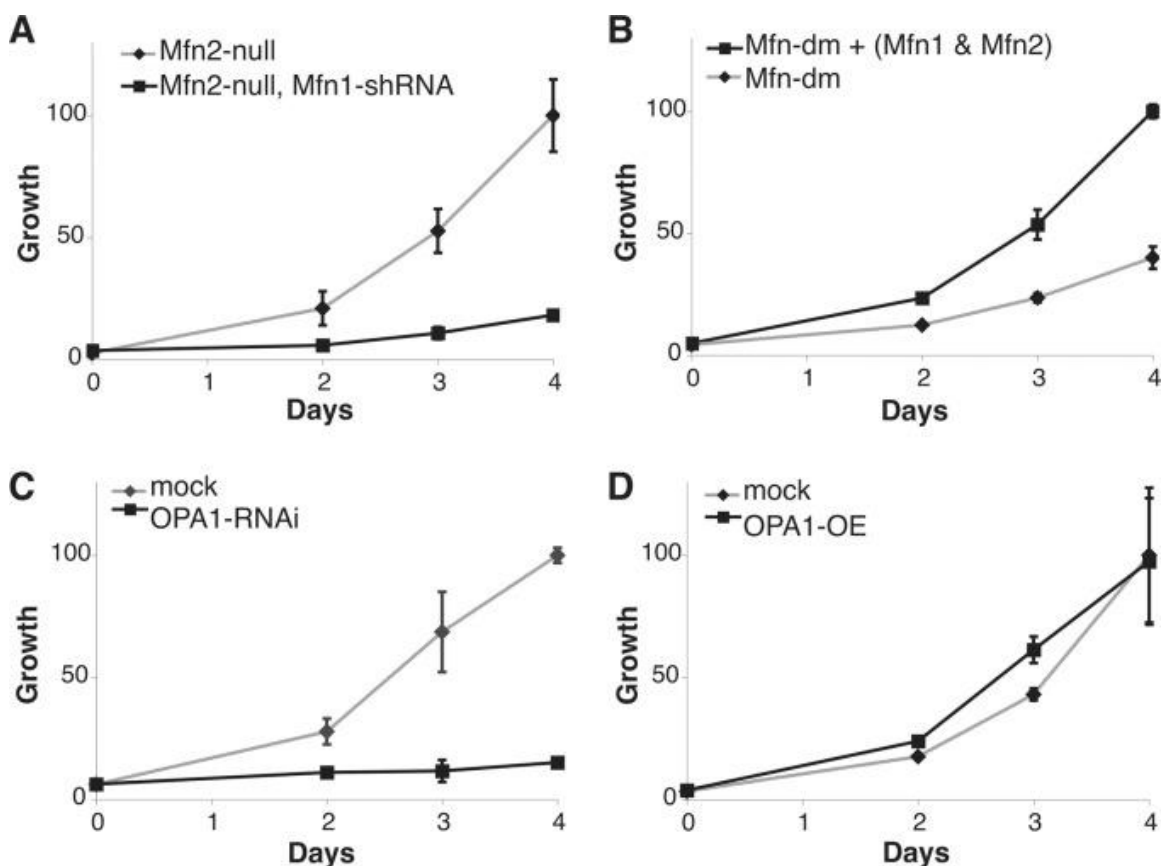


FIGURA 3

Crecimiento de células fibroblásticas con diferentes genotipos: (A) Mfn2-null (sin expresión de Mfn2) con o sin Mfn1-RNAi (con expresión reducida de Mfn1), (B) Mfn-dm (dobles mutantes sin expresión de Mfn1 ni Mfn2), con o sin sobre-expresión de Mfn1 y Mfn2, (C) células wild-type (sin mutaciones) con o sin OPA1-RNAi (con expresión reducida de OPA1), (D) células wild-type con o sin sobre-expresión de OPA1 (OPA1-OE). Las células fueron contadas por triplicado. Se presenta la media del número de células y el desvío estándar. El número de células en el día 4 de la condición wild-type fue tomado como 100%.

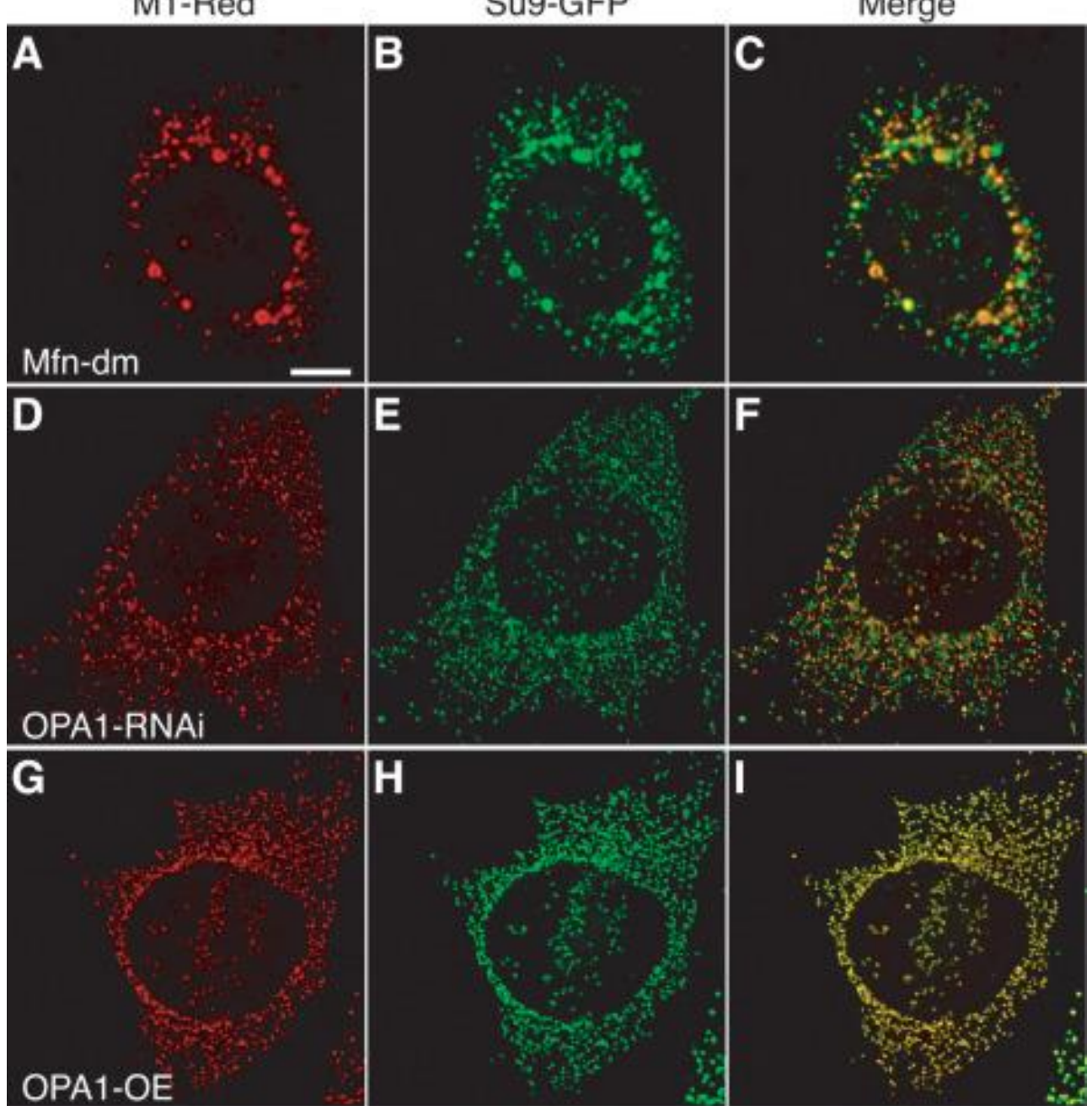


FIGURA 4

Análisis del potencial mitocondrial por medio del uso de Mito-Tracker Red. Este marcador sólo es incorporado en mitocondrias que presentan una diferencia de potencial a través de la membrana mitocondrial interna. Además las mitocondrias están marcadas con Su9-GFP (péptido señal de subunidad 9 de F₀-ATPasa fusionado a GFP). (A–C) Mfn-dm (células sin expresión de Mfn1 ni Mfn2), (D–F) OPA1-RNAi (con expresión reducida de OPA1), (G–I) OPA1-OE (sobre-expresión de OPA1). Scale bar represents 10 μ m.

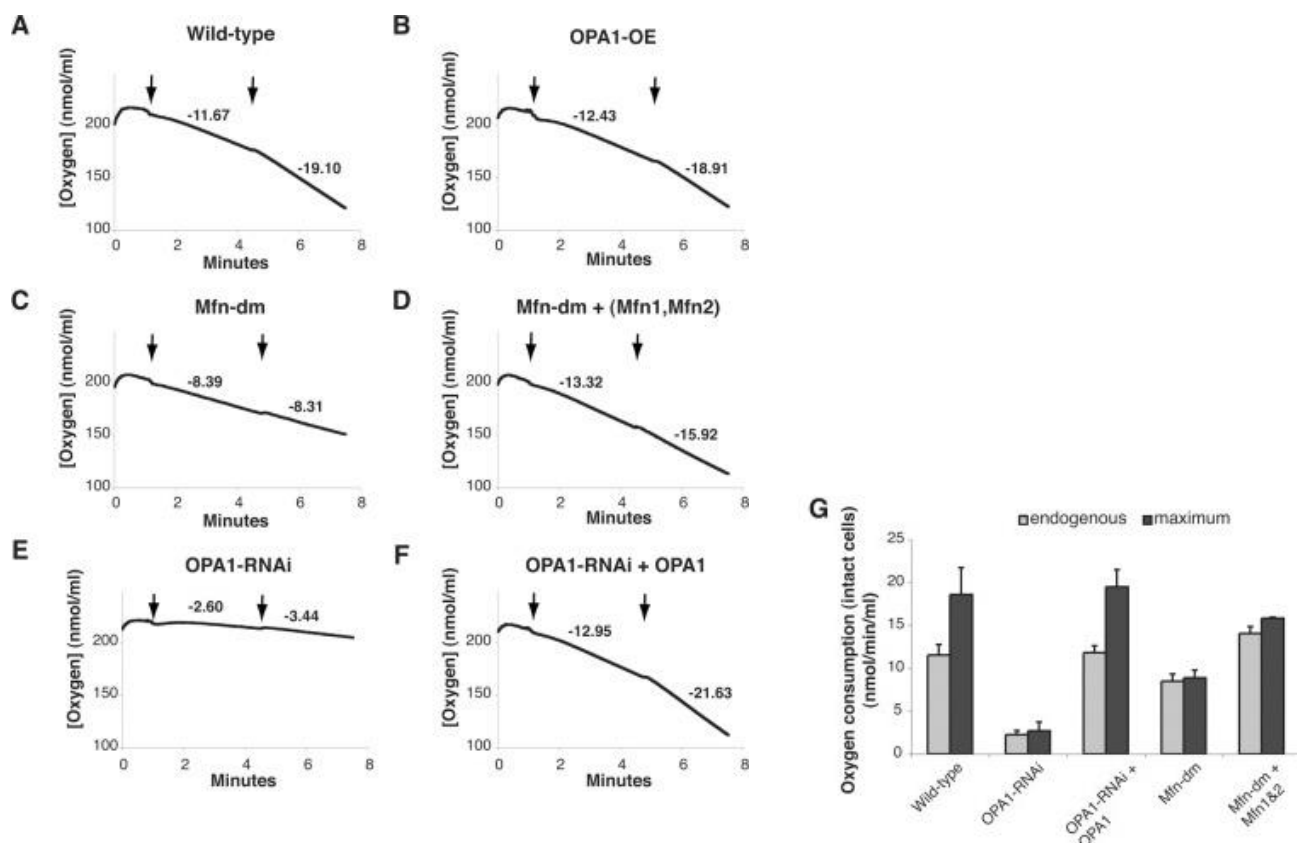


FIGURA 5

El consumo de oxígeno fue medido a través de un electrodo. Primero se midió el ritmo endógeno de consumo de oxígeno (lapso de tiempo entre flechas). La segunda flecha indica el agregado de un ionóforo de protones (2,4-dinitrofenol) para inducir el desacople del transporte de electrones y la producción de ATP. Luego de disiparse el gradiente de H^+ ocurre una respuesta compensatoria que resulta en respiración en capacidad máxima. Los números indican la velocidad de consumo de oxígeno (nmol/ml/min). Condiciones: (A) células wild-type (sin mutaciones), (B) OPA1-OE (con sobre-expresión de OPA1), (C) células Mfn-dm (sin expresión de Mfn1 y Mfn2), (D) células Mfn-dm con expresión de Mfn1 y Mfn2 exógena, (E) células OPA1-RNAi (con baja expresión de OPA1), (F) células OPA1-RNAi con expresión exógena de OPA1. (G) Gráfica comparando los valores de velocidad de consumo de oxígeno para las diferentes condiciones. El alto de las barras indica la media y las barra de error representan el desvío estándar.