

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**REGULACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MITOCONDRIA-
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y EL METABOLISMO
MITOCONDRIAL DURANTE EL ESTRÉS
PROTEOTÓXICO MITOCONDRIAL**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
académico de Doctor en Bioquímica por:

CAMILA PAZ LÓPEZ CRISOSTO

Director de Tesis: Dr. Sergio Lavandero González

Santiago, Chile

Agosto 2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

CAMILA PAZ LÓPEZ CRISOSTO

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen público rendido el día _____ de Agosto del 2017.

Director de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero González

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Lee Meisel (Presidente)

Dra. Julieta González

Dr. Jorge Ferreira

Dedicada a
mi familia, por su apoyo.

Esta tesis de Doctorado se llevó a cabo en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, dirigido por el Dr. Sergio Lavandero, el cual pertenece al Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), en las Facultades de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Medicina de la Universidad de Chile.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca Conicyt para Estudios de Doctorado en Chile 2013 #21130200 (CL)
- Proyecto FONDAP 15130011 (Dr. Sergio Lavandero)
- Proyecto FONDECYT 1161156 (Dr. Sergio Lavandero)

La presente tesis de Doctorado y colaboraciones paralelas han dado origen a las siguientes actividades de difusión:

a) Presentaciones a congresos:

- **López-Crisosto C**, Lavadero S. "Cell metabolism increases in the early stage of mitochondrial unfolded protein response in HeLa cells". XXXVIII Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Poster session. Puerto Varas, Chile. 22-25 Septiembre 2015.
- **López-Crisosto C**, Lavadero S. "Doxycycline induces the mitochondrial unfolded protein response and increases mitochondrial metabolism in HeLa cells". XXXIX Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Poster session. Puerto Varas, Chile. 27-30 Septiembre 2016.
- **López-Crisosto C**, Díaz-Vegas A, Lavadero S. "Mitochondrial metabolism and ER-mitochondrial coupling increase during doxycycline-induced mitochondrial stress in HeLa cells". Sesión oral y poster. Simposio Jóvenes científicos SBBq-Conesul, XLVI Reunión Anual SBBq, Águas de Lindóia, Brasil. 27-30 Julio 2017.

b) Publicaciones:

- Bravo-Sagua R, Rodriguez AE, Kuzmicic J, Gutierrez T, **López-Crisosto C**, Quiroga C, Chiong M, Gillette TG, Rothermel BA, Lavadero S. *Cell death and survival through the endoplasmic reticulum-mitochondrial axis*. Current Molecular Medicine 13:317-29, 2013.
- Parra V, Moraga F, Kuzmicic J, **López-Crisosto C**, Troncoso R, Torrealba N, Criollo A, Díaz-Elizondo J, Rothermel BA, Quest AF, Lavadero S. *Calcium and mitochondrial metabolism in ceramide-induced cardiomyocyte death*. Biochimica Biophys Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 1832:1334-44, 2013.
- Parra V, Verdejo HE, Iglewski M, Del Campo A, Troncoso R, Jones D, Zhu Y, Kuzmicic J, Pennanen C, **Lopez-Crisosto C**, Jaña F, Ferreira J, Noguera E, Chiong M, Bernlohr DA, Klip A, Hill JA, Rothermel BA, Abel ED, Zorzano A, Lavadero S. *Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFkB-Opa-1 signaling pathway*. Diabetes 63:75-88, 2014.
- del Campo A, Parra V, Vásquez-Trincado C, Gutiérrez T, Morales PE, **López-Crisosto C**, Bravo-Sagua R, Navarro-Marquez MF, Verdejo HE, Contreras-Ferrat A, Troncoso R, Chiong M, Lavadero S. *Mitochondrial fragmentation impairs insulin-dependent glucose uptake by modulating Akt activity through mitochondrial Ca²⁺ uptake*. American Journal of Physiology, Endocrinology & Metabolism 306:E1-E13, 2014.

- Bravo R, Torrealba N, Paredes F, Morales PE, Pennanen C, **López-Crisosto C**, Troncoso R, Chiong M, Simmen T, Quest AF, Lavandero S. *Organelle communication: Signaling crossroads of homeostasis and disease*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology 50:55-9, 2014.
- Pennanen C, Parra V, **López-Crisosto C**, Morales PE, Del Campo A, Gutierrez T, Rivera-Mejías P, Kuzmicic J, Chiong M, Zorzano A, Rothermel BA, Lavandero S. *Mitochondrial fission is required for cardiomyocyte hypertrophy via a Ca²⁺-calcineurin signalling pathway*. Journal of Cell Science 127:2659-71, 2014.
- Troncoso R, Paredes F, Parra V, Gatica D, Vázquez-Trincado C, Quiroga C, Bravo-Sagua R, **Lopez-Crisosto C**, Rodriguez AE, Oyarzún AP, Kroemer G, Lavandero S. *Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance*. Cell Cycle 13:2281-95, 2014.
- Kuzmicic J, Parra V, Verdejo HE, **López-Crisosto C**, Chiong M, García L, Jensen MD, Bernlohr D, Castro PF, Lavandero S. *Trimetazidine prevents palmitate-induced mitochondrial fission and dysfunction in cultured cardiomyocytes*. Biochemical Pharmacology 91:323-36, 2014.
- Gutierrez T, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Contreras-Ferrat A, Vasquez-Trincado C, Morales PE, **López-Crisosto C**, Sotomayor-Flores C, Chiong M, Rothermel BA, Lavandero S. *Alteration in mitochondrial Ca²⁺ uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes*. Cell Communication & Signaling 12:68, 2014.
- Westermeier F, Navarro-Marquez M, **Lopez-Crisosto C**, Bravo-Sagua B, Quiroga C, Bustamante M, Zalaquett R, Verdejo HE, Ibacache M, Parra V, Castro PF, Rothermel BA, Hill JA, Lavandero S. *Defective insulin signalling in diabetic cardiomyopathy and mitochondrial* Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research 1853:1113-1118, 2015.
- **López-Crisosto C**, Bravo-Sagua R, Rodríguez-Peña M, Mera C, Castro PF, Quest AF, Rothermel BA, Cifuentes M, Lavandero S. *ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease 1852:2096-2105, 2015.
- Oyarzún AP, Westermeier F, Pennanen C, **López-Crisosto C**, Parra V, Sotomayor-Flores C, Sánchez G, Pedrozo Z, Troncoso R, Lavandero S. *FK866 compromises mitochondrial metabolism and adaptive stress responses in cultured cardiomyocytes*. Biochemical Pharmacology 98:92-101, 2015.
- Rodríguez AE, **López-Crisosto C**, Peña-Oyarzún D, Salas D, Parra V, Quiroga C, Morawe T, Chiong M, Behl C, Lavandero S. *BAG3 regulates total MAP1LC3B protein levels through a translational but not transcriptional mechanism*. Autophagy 12:287-96, 2016.
- Bravo-Sagua R*, **López-Crisosto C***, Parra V, Rodríguez-Peña M, Rothermel BA, Quest AF, Lavandero S. *mTORC1 inhibitor rapamycin and ER stressor tunicamycin induce differential patterns of ER-mitochondria coupling*. Scientific Reports 6:36394, 2016. *Comparte primera autoría.

- Bravo-Sagua R, Parra V, **López-Crisosto C**, Díaz P, Quest AF, Lavandero S. *Calcium transport and signaling in mitochondria*. *Comprehensive Physiology* 7:623-634, 2017.
- **Lopez-Crisosto C***, Pennanen C*, Vasquez-Trincado C, Morales PE, Bravo-Sagua R, Quest AF, Chiong M, Lavandero S. *Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology*. *Nature Reviews - Cardiology* 14:342-360, 2017. *Comparte primera autoría.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me han acompañado y han hecho posible el desarrollo y la finalización de este trabajo.

Al Dr. Sergio Lavandero, por su constante guía, apoyo y confianza. A los integrantes de mi comisión evaluadora, por su apoyo, buena disposición y sus valiosos comentarios.

A todos los integrantes del laboratorio de Transducción de Señales Moleculares y laboratorios asociados, por su capacidad de combinar su calidad profesional con su calidad humana. Gracias por su compañía, amistad, apoyo y por todos los buenos momentos compartidos.

A mi familia, por su constante compañía, preocupación y buenos deseos.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	14
RESUMEN.....	18
SUMMARY	20
1. INTRODUCCIÓN.....	22
1.1. Homeostasis proteica	22
1.1.1. Respuesta a proteínas mal plegadas.....	23
1.2. Mitocondrias	25
1.2.1. Control de calidad mitocondrial.....	26
1.2.2. UPR mitocondrial.....	29
1.3. Mitohormesis	32
1.4. Comunicación entre organelos	34
1.4.1. Comunicación mitocondria-núcleo	34
1.4.2. Comunicación mitocondria-RE.....	35
1.4.3. Comunicación mitocondria-RE durante estrés celular.....	37
2. HIPÓTESIS	39
3. OBJETIVO GENERAL.....	39
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
5.1. Reactivos.....	40
5.2. Cultivo celular	41
5.3. Conteo de células viables mediante azul de tripán	41
5.4. Estímulo con doxiciclina.....	42
5.5. Preparación de extractos proteicos totales	42
5.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas	43
5.7. Western blot.....	43
5.8. Extracción del RNA total.....	44
5.9. Reacción de retrotranscripción	44
5.10. Validación de partidores para qPCR.....	44
5.11. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR) en tiempo real	47
5.12. Ensayo de viabilidad celular con azul de tripán.....	47

5.13. Ensayo de viabilidad celular mediante incorporación de yoduro de propidio	48
5.14. Evaluación de la población subG1 mediante citometría de flujo.....	48
5.15. Amplificación de plásmidos.....	49
5.16. Evaluación de la mitofagia mediante el sensor mitoKeima.....	49
5.17. Medición de los niveles intracelulares de ATP	49
5.18. Medición de la velocidad de consumo de O ₂ mediante oxigrafía de Clark.....	50
5.19. Evaluación del potencial mitocondrial	50
5.20. Inmunofluorescencia indirecta.....	51
5.21. Evaluación de los contactos RE-mitocondria mediante el sensor Split-GFP	52
5.22. Medición de Ca ²⁺ mitocondrial bajo estímulo con histamina.....	52
5.23. Medición de Ca ²⁺ mitocondrial basal.....	53
5.24. Análisis digital de imágenes.....	53
5.25. Análisis estadístico	54
6. RESULTADOS	55
6.1. Efecto de la doxiciclina sobre el balance de expresión de proteínas mitocondriales	55
6.2. Efecto de la doxiciclina sobre la expresión de genes blanco de la UPR ^{mt}	58
6.3. Efecto de la doxiciclina sobre la viabilidad celular	61
6.4. Efecto de la doxiciclina sobre el proceso de mitofagia	67
6.5. Efecto de la exposición temprana a doxiciclina en los niveles intracelulares de ATP	70
6.6. Efecto de la exposición temprana a doxiciclina en la tasa de respiración celular ..	71
6.7. Efecto de la exposición temprana a doxiciclina en el acoplamiento físico entre RE y mitocondria	75
6.8. Efecto de la exposición temprana a doxiciclina sobre el acoplamiento funcional entre RE y mitocondria	80
7. DISCUSIÓN.....	84
7.1. Proteostasis y adaptación frente a estrés proteotóxico	84
7.2. UPR ^{mt} y control de calidad mitocondrial	85
7.3. Estrés mitocondrial y metabolismo.....	88
7.4. Estrés celular y comunicación entre organelos	90
7.5. Estrés mitocondrial y comunicación con el RE	92
7.6. Distribución de los contactos entre mitocondrias y RE.....	93

7.7. Estrés mitocondrial, adaptación y mitohormesis	94
7.8. Perspectivas	96
8. CONCLUSIONES	97
9. BIBLIOGRAFÍA.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de señalización de las respuestas frente a proteínas mal plegadas.....	24
Figura 2. Control de calidad mitocondrial.....	28
Figura 3. Vía de señalización de la UPR ^{mt}	31
Figura 4. Comunicación entre mitocondrias y RE.....	37
Figura 5. Efecto del tratamiento con doxiciclina 15 µg/mL sobre la expresión de proteínas mitocondriales codificadas en DNA nuclear y mitocondrial en células HeLa.....	57
Figura 6. Efecto del tratamiento con doxiciclina 60 µg/mL sobre la expresión de proteínas mitocondriales codificadas en DNA nuclear y mitocondrial en células HeLa.....	58
Figura 7. Efecto del tratamiento con doxiciclina 15 µg/mL sobre la expresión de genes marcadores de UPR ^{mt} en células HeLa.....	59
Figura 8. Efecto del tratamiento con doxiciclina 60 µg/mL sobre la expresión de genes marcadores de UPR ^{mt} en células HeLa.....	60
Figura 9. Efecto del tratamiento con doxiciclina sobre la expresión de un gen marcador de UPR ^{RE} en células HeLa.....	61
Figura 10. Efecto del tratamiento con doxiciclina 15 µg/mL sobre la incorporación de yoduro de propidio (PI) en células HeLa.....	62
Figura 11. Efecto del tratamiento con doxiciclina 60 µg/mL sobre la incorporación de yoduro de propidio (PI) en células HeLa.....	63
Figura 12. Efecto del tratamiento con doxiciclina 15 µg/mL sobre la población subG1 en células HeLa.....	65
Figura 13. Efecto del tratamiento con doxiciclina 60 µg/mL sobre la población subG1 en células HeLa.....	66
Figura 14. Estandarización del sensor de mitofagia mitoKeima en células HeLa.....	68
Figura 15. Efecto de doxiciclina sobre la mitofagia en células HeLa.....	69
Figura 16. Efecto de doxiciclina en los niveles intracelulares de ATP en células HeLa.....	71
Figura 17. Efecto de doxiciclina 15 µg/mL sobre la tasa de respiración celular en células HeLa.....	72
Figura 18. Efecto de doxiciclina 60 µg/mL sobre la tasa de respiración celular en células HeLa.....	73
Figura 19. Efecto de doxiciclina 60 µg/mL sobre el potencial mitocondrial en células HeLa.....	74
Figura 20. Efecto de doxiciclina sobre los contactos RE-mitocondria evaluados mediante Inmunofluorescencia indirecta en células HeLa.....	76
Figura 21. Ensayo de la evaluación de los contactos RE-mitocondria con el sensor Split-GFP en células HeLa.....	77

Figura 22. Efecto de doxíciclina 60 µg/mL sobre los contactos RE-mitocondria evaluados con el sensor Split-GFP en células HeLa.....	78
Figura 23. Efecto de doxíciclina 60 µg/mL sobre los contactos RE-mitocondria evaluados con el sensor short Split-GFP en células HeLa.....	79
Figura 24. Efecto de doxíciclina 60 µg/mL sobre los contactos RE-mitocondria evaluados con el sensor long Split-GFP en células HeLa.....	80
Figura 25. Efecto de doxíciclina 60 µg/mL en la captación de Ca ²⁺ mitocondrial en células HeLa.....	81
Figura 26. Efecto de doxíciclina 60 µg/mL sobre el Ca ²⁺ mitocondrial basal en células HeLa.....	83
Figura 27. UPR ^{mt} y adaptación metabólica	88
Figura 28. Representación de la comunicación entre núcleo y mitocondrias	91
Figura 29. Estrés mitocondrial y regulación de la longevidad.....	95
Figura 30. Modelo final	98

ABREVIATURAS

µg	: Microgramo
µL	: Micro litro
µM	: Micromolar
µm	: Micrómetro
ABC	: <i>ATP-binding cassette</i>
ANOVA	: Análisis de la varianza
ATF-5	: <i>Activating transcription factor 5</i>
ATFS-1	: <i>Activating Transcription Factor associated with Stress</i>
ATP	: Adenosina trifosfato
BSA	: Albúmina de suero bovino
bZip	: Dominio de cremallera de leucina
C/EBPβ	: <i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>
Ca ²⁺	: Ion calcio
CCCP	: Carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona
CHOP	: Proteína C/Ebp-homóloga
ClpP	: Subunidad proteolítica de la proteasa caseinolítica dependiente de ATP
C _T	: Ciclo umbral
DAG	: Diacilglicerol
DAPI	: 4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	: Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
DNAc	: DNA complementario
E	: Eficiencia de la reacción de qPCR
EBSS	: Solución salina balanceada de Earle
ECL	: Quimioluminiscencia aumentada (<i>Enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
ETC	: Cadena transportadora de electrones (<i>Electron Transport Chain</i>)
FBS	: Suero fetal bovino
FCCP	: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FSC	: Dispersión frontal (<i>Forward Scatter</i>)
G	: Fuerza de gravedad

GFP	: Proteína fluorescente verde
Grp75	: <i>Glucose-regulated protein 75</i>
h	: Horas
HPRT	: Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa
HSF-1	: Factor de shock térmico 1 (<i>Heat-Shock Factor 1</i>)
HSPA5	: Miembro 5 de la familia A de proteínas <i>heat shock</i>
HSR	: Respuesta frente a shock térmico (<i>Heat-shock Response</i>)
IMM	: Membrana mitocondrial interna (<i>Inner Mitochondrial Membrane</i>)
IMS	: Espacio intermembrana (<i>Inter-Membrane Space</i>)
IP ₃	: Inositol 1,4,5-trisfosfato
IP ₃ R	: Receptor de IP ₃
kDa	: kilo Dalton
LSM	: Microscopía de rastreo láser (<i>Laser Scanning Microscopy</i>)
mA	: Mili Amperio
MAM	: Membranas de RE asociadas a mitocondria (<i>Mitochondrial-Associated ER Membrane</i>)
mCU	: Uniporter de calcio mitocondrial (<i>Mitochondrial Calcium Uniporter</i>)
Mfn	: Mitofusina
Mg	: Mili gramo
min	: Minutos
mL	: Mili litro
mM	: Mili molar
Mm	: Milímetro
mRNA	: RNA mensajero
MSR	: Elemento de respuesta a estrés mitocondrial (<i>Mitochondrial stress response element</i>)
MTCO1	: Citocromo c oxidasa subunidad I
mtDNA	: DNA mitocondrial
mtHsp60	: Proteína " <i>heat shock</i> " -60 de la mitocondria
mtHsp70	: Proteína " <i>heat shock</i> " -70 de la mitocondria
mTORC1	: <i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
mtΔψ	: Potencial de membrana mitocondrial

MURE	: Elemento de respuesta a UPR ^{mt} (<i>Mitochondrial Unfolded protein Response Element</i>)
nM	: Nano molar
Nm	: Nanómetro
O/A	: Oligomicina/Antimicina A
OMM	: Membrana mitocondrial externa (<i>Outer Mitochondrial Membrane</i>)
OTC	: Ornitina transcarbamilasa
PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	: Solución amortiguadora de fosfato salino
PI	: Yoduro de propidio (<i>Propidium iodide</i>)
PINK1	: <i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PSF	: Función de dispersión puntual (<i>Point Spread Function</i>)
qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RE	: Retículo Endoplásmico
RFP	: Proteína fluorescente roja
RIPA	: Solución amortiguadora para ensayos de radioinmunoprecipitación
RNA	: Ácido ribonucleico
RNAsa	: Ribonucleasa
ROS	: Especies reactivas del oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
RPMI	: Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	: RNA ribosomal
RT	: Retrotranscripción
SDHA	: Succinato deshidrogenasa subunidad A
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
seg	: Segundos
SEM	: Error estándar de la media
TBS	: Solución amortiguadora de Tris salino
TetON	: Sistema de expresión inducible activado por tetraciclinas
TIM	: Translocasa de la membrana interna (<i>Translocase of the Inner Membrane</i>)
TMRM	: Tetrametilrodamina metil-éster
TOM	: Translocasa de la membrana externa (<i>Translocase of the Outer Membrane</i>)
tRNA	: RNA de transferencia

UPR	: Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded Protein Response</i>)
UPR ^{mt}	: UPR mitocondrial
UPR ^{RE}	: UPR de retículo endoplásmico
VDAC	: Canal de aniones dependiente de voltaje (<i>Voltage Dependent Anion Channel</i>)
ΔC_T	: Diferencia de C_T entre el control experimental y la muestra problema
ΔOTC	: Ornitina transcarbamilasa mutante, con delección de los aminoácidos 30-114

RESUMEN

La acumulación de proteínas mal plegadas dentro de las mitocondrias genera una respuesta transcripcional adaptativa, denominada UPR mitocondrial. A través de esta respuesta, las mitocondrias señalizan hacia el núcleo para aumentar la expresión de genes que permiten restaurar la homeostasis proteica. Sin embargo, se desconoce si además de esta respuesta genética, existe un cambio adaptativo en el metabolismo celular en las etapas tempranas del estrés mitocondrial. El acoplamiento físico-funcional del retículo endoplásmico (RE) con la mitocondria es uno de los principales reguladores del metabolismo mitocondrial, el cual permite el traspaso directo de Ca^{2+} entre ambos organelos. En la mitocondria, el Ca^{2+} actúa como cofactor de enzimas que participan en el ciclo de Krebs, potenciando la producción de ATP. No obstante, actualmente no existe información sobre posibles cambios en el acoplamiento mitocondria-RE y su papel durante el estrés mitocondrial. A partir de estos antecedentes, se planteó como hipótesis de esta tesis que la acumulación de proteínas mal plegadas al interior de la mitocondria (UPR mitocondrial) favorece el aumento del metabolismo mitocondrial y el incremento en el contacto funcional entre mitocondria y RE.

Para responder esta hipótesis se trabajó con la línea celular HeLa, induciendo el estrés mitocondrial mediante el tratamiento con doxiciclina, antibiótico que inhibe la traducción de proteínas en la mitocondria. De esta forma, se produce un desbalance entre la expresión de las subunidades nucleares y mitocondriales de los complejos respiratorios lo que lleva a estrés por acumulación de proteínas no ensambladas. En estas condiciones se estableció que el tratamiento con doxiciclina produce, entre las 24 y 72 h, un desbalance mito-nuclear de proteínas que son parte de los complejos respiratorios e induce la respuesta frente a este estrés en cuanto a expresión de marcadores de la UPR mitocondrial (CHOP, C/EBP β , ClpP, mtHsp60), sin afectar la viabilidad celular.

Por otra parte, a tiempos cortos de tratamiento, de entre 2 y 4 h, la doxiciclina aumentó los parámetros metabólicos celulares, como los niveles totales de ATP y el consumo de oxígeno. A estos mismos tiempos de tratamiento, doxiciclina incrementó los contactos físicos y funcionales entre mitocondrias y RE, evaluados mediante colocalización por

inmunofluorescencia indirecta y cinéticas de captación de Ca^{2+} mitocondrial por microscopía confocal.

Se puede concluir que el estrés mitocondrial inducido por doxiciclina estimula el acoplamiento RE-mitocondria y una potenciación del metabolismo celular a tiempos tempranos. Estos resultados sugieren que esta respuesta metabólica favorece la adaptación celular frente al estrés mitocondrial.

SUMMARY

The accumulation of unfolded proteins within the mitochondria generates an adaptive transcriptional response, denominated mitochondrial UPR. Through this response, the mitochondria signal back towards the nucleus to increase gene expression that allow restoring protein homeostasis. However, it is still unknown whether, in addition to this genetic response, there is an adaptive change in cell metabolism in the early stages of mitochondrial stress. The physical-functional coupling of the endoplasmic reticulum (ER) with the mitochondria is one of the main regulators of mitochondrial metabolism, which allows the direct transfer of Ca^{2+} between both organelles. In mitochondria, Ca^{2+} acts as a cofactor of enzymes involved in the Krebs cycle, enhancing ATP production. However, there is currently no information on possible changes in mitochondrial-ER coupling and its role during mitochondrial stress. From this background, we hypothesized that the accumulation of unfolded proteins inside the mitochondria (mitochondrial UPR) favours the increase in mitochondrial metabolism and in the functional contact between mitochondria and ER.

To address this hypothesis, we worked with the HeLa cell line, inducing mitochondrial stress by treatment with doxycycline, an antibiotic that inhibits the translation of mitochondrial-encoded proteins. In this way, there is an imbalance between the expression of nuclear and mitochondrial subunits of the respiratory complexes leading to a stress by accumulation of non-assembled proteins. Under these conditions, we established that the treatment with doxycycline produces a mito-nuclear imbalance of the proteins, between 24 and 72 h, that are part of the respiratory complexes and induces the response against this stress as an expression of the mitochondrial UPR markers (CHOP, C/EBP β , ClpP, mtHsp60), without affecting cell viability.

On the other hand, at short treatment times (between 2 and 4 h), doxycycline increased cellular metabolic parameters, such as total ATP levels and oxygen consumption. At these times, doxycycline increases the physical and functional contacts between mitochondria and ER, evaluated by indirect immunofluorescence colocalization and kinetics of mitochondrial Ca^{2+} uptake using confocal microscopy.

In summary, the mitochondrial stress induced by doxycycline stimulates an early mitochondrial-RE coupling and potentiates cell metabolism. These results suggest that this metabolic response favours cellular adaptation to mitochondrial stress.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Homeostasis proteica

La homeostasis es una propiedad de todos los organismos vivos que permite mantener distintas variables biológicas claves en un nivel relativamente constante a pesar de los cambios ambientales externos al organismo. Esta propiedad fue definida en el siglo XVII por el científico Claude Bernard como la “constancia del medio interno”, otorgándole el rango de requisito indispensable para la vida independiente, ya que permite mantener las condiciones necesarias para la vida sin importar las perturbaciones del medio ambiente (Bernard, 1974). Algunos ejemplos de homeostasis en la fisiología son la mantención de la temperatura corporal, de la concentración de glucosa e iones en el torrente sanguíneo, y la regulación del pH del medio extracelular. La homeostasis se mantiene gracias a una serie de sistemas de control, basados en la retroalimentación, donde se distinguen los siguientes componentes: la variable o característica controlada; uno o más sensores que detectan los cambios en la variable; un sistema de control o integrador, que recibe e interpreta la información de los sensores y pone en marcha un mecanismo de compensación; y efectores, que actúan sobre la variable produciendo la respuesta.

La homeostasis proteica, o proteostasis, consiste en mantener la estabilidad y funcionalidad de todas las proteínas dentro de una célula u organismo. Las proteínas deben alcanzar y mantener una estructura tridimensional que les permita cumplir con su función. Para este fin, se deben coordinar los procesos de síntesis proteica, plegamiento, modificaciones post-traduccionales, ensamblaje de complejos proteicos y degradación de las proteínas alteradas o que ya han cumplido su vida útil (Broadley & Hartl, 2008; Jovaisaite et al., 2014). Estos procesos son regulados por la acción de chaperonas moleculares, las cuales promueven el correcto plegamiento de las proteínas recién sintetizadas, previenen la agregación de proteínas durante el plegamiento y ayudan en el ensamblaje de complejos proteicos (Haynes & Ron, 2010). Por otra parte, si una proteína no logra plegarse adecuadamente, se encuentra dañada o ya ha cumplido su vida útil, existen diversos mecanismos dependientes de proteasas que promueven su degradación (López-Otín et al., 2013; Quirós et al., 2015).

1.1.1. Respuesta a proteínas mal plegadas

La mantención de la proteostasis requiere de un fino balance entre los niveles de chaperonas y sus proteínas cliente. Diversos tipos de estrés pueden llevar a una sobrecarga de proteínas mal plegadas al interior de una célula, alterando este balance. Cuando esto ocurre se activan vías de señalización adaptativas conocidas genéricamente como “respuestas a proteínas mal plegadas” (UPRs, por sus siglas en inglés “*Unfolded Protein Responses*”) (Broadley & Hartl, 2008; Haynes & Ron, 2010; Jovaisaite et al., 2014; Pellegrino et al., 2013). Las UPRs comprenden cuatro etapas: (a) Detección de las proteínas mal plegadas; (b) Transducción de la señal de estrés hacia el núcleo; (c) Activación de programas genéticos adaptativos, que incluyen un aumento en la expresión de chaperonas y proteasas para el control de calidad proteico; y (d) Restauración de la homeostasis (Jovaisaite et al., 2014).

Debido a la complejidad de las células eucariontes, las proteínas mal plegadas pueden acumularse en diversos compartimentos celulares. Es así que existen vías de señalización de UPR independientes para cada compartimento subcelular (**Figura 1**). En la literatura se han descrito tres tipos de UPR dependiendo del lugar de origen de la señal (Broadley & Hartl, 2008; Haynes & Ron, 2010; Jovaisaite et al., 2014). La primera de ellas se origina en el citosol y se conoce como “respuesta citosólica frente a shock térmico” (HSR, por sus siglas en inglés “*Heat-Shock Response*”). Esta respuesta es regulada por el factor transcripcional *Heat-shock Factor 1* (HSF-1). En condiciones basales, HSF-1 se asocia a chaperonas citosólicas que inhiben su translocación al núcleo. Cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el citosol, las chaperonas se unen a éstas, liberando a HSF-1 y permitiendo la activación de la respuesta a nivel nuclear (**Figura 1a**) (Lindquist, 1986).

El retículo endoplásmico (RE) es el principal lugar de síntesis y plegamiento de proteínas de membrana y de secreción. Las proteínas sintetizadas por esta vía deben plegarse correctamente dentro del lumen del RE, por lo cual este organelo cuenta con una amplia maquinaria de control de calidad proteico (Lee & Ozcan, 2014). Cuando el manejo de las proteínas dentro del RE se altera y se acumulan proteínas mal plegadas, se gatilla la respuesta frente a proteínas mal plegadas del RE (UPR^{RE}) (Broadley & Hartl,

2008; Haynes & Ron, 2010; Jovaisaite et al., 2014; Lee & Ozcan, 2014; Pellegrino et al., 2013). La UPR^{RE} comprende tres vías de señalización complementarias que, en conjunto, ayudan a reducir la carga proteica del RE con el fin de recuperar la homeostasis (**Figura 1b**) (Lee & Ozcan, 2014).

Finalmente, en los últimos años se le ha dado más visibilidad a otra clase de UPR, conocida como UPR mitocondrial (UPR^{mt}), generada en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el interior de las mitocondrias (**Figura 1c**) (Broadley & Hartl, 2008; Haynes et al., 2013; Haynes & Ron, 2010; Jovaisaite et al., 2014; Pellegrino et al., 2013; Yoneda et al., 2004). Esta nueva vía de señalización se describirá en detalle más adelante.

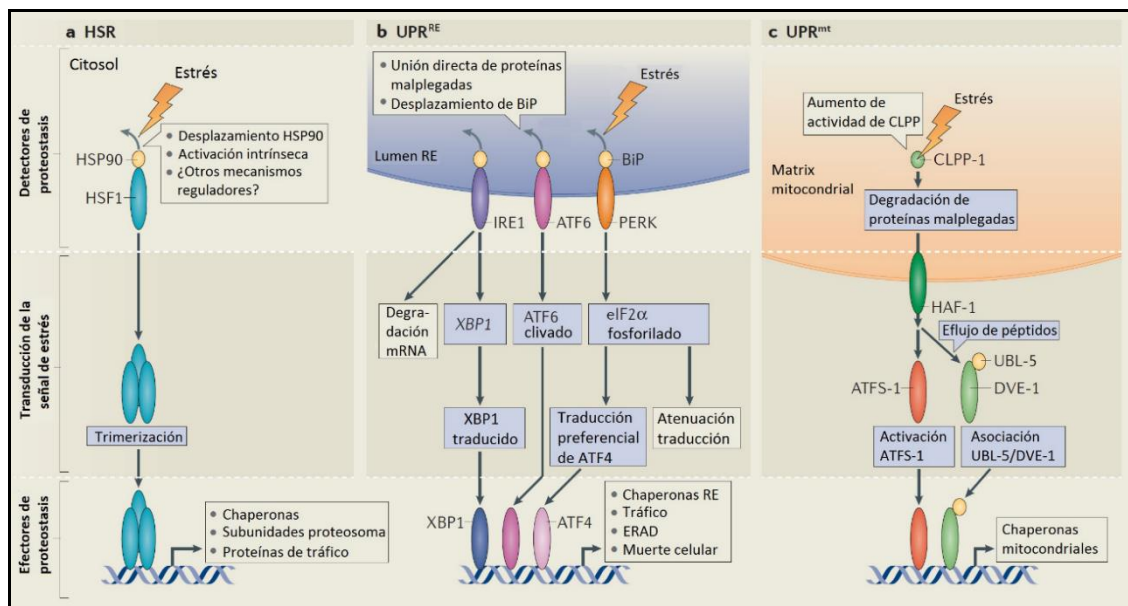


Figura 1. Vías de señalización de las respuestas frente a proteínas mal plegadas. En este esquema se muestra de forma comparativa los factores involucrados en la detección del estrés proteotóxico, la transducción de la señal de estrés y los efectores que restauran la proteostasis para las tres principales clases de UPR. (a) Respuesta citosólica frente a shock térmico. (b) UPR de retículo endoplásmico (RE). (c) UPR mitocondrial. HSR: *heat shock response*. ERAD: *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*. (Adaptado de Taylor et al., 2014)

1.2. Mitocondrias

Las mitocondrias son organelos subcelulares complejos originados por la incorporación de bacterias aeróbicas en las células eucariontes primitivas, mediante un mecanismo de endosimbiosis, hace aproximadamente 1.500 millones de años (Barbour & Turner, 2014; Whelan & Zuckerbraun, 2013). Las mitocondrias son organelos formados por una doble membrana, que constan de cuatro compartimentos bien definidos: la membrana mitocondrial externa (OMM, por sus siglas en inglés *Outer Mitochondrial Membrane*), el espacio intermembrana (IMS, por sus siglas en inglés *Inter-Membrane Space*), la membrana mitocondrial interna (IMM, por sus siglas en inglés *Inner Mitochondrial Membrane*) y la matriz mitocondrial (Pellegrino et al., 2013; Ryan & Hoogenraad, 2007). Las mitocondrias cumplen diversas funciones relacionadas con el metabolismo energético, la señalización intracelular, el almacenamiento de calcio (Ca^{2+}) y la apoptosis, entre otras (Chandel, 2015). En las mitocondrias se produce la mayor parte del ATP celular derivado de la oxidación, a través del ciclo de Krebs, de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas (Bravo-Sagua et al., 2013; Kuzmicic et al., 2011; McBride et al., 2006).

Debido a su origen endosimbionte, las mitocondrias son organelos semiautónomos que poseen su propio genoma, contenido en el DNA mitocondrial (mtDNA) (Latorre-Pellicer et al., 2016; Wallace, 2016; Whelan & Zuckerbraun, 2013). Sin embargo, durante la evolución de los organismos eucariontes, la mayor parte del genoma mitocondrial se transfirió al genoma nuclear, quedando sólo 37 genes codificados en el mtDNA. De éstos, 13 codifican para proteínas que participan en la cadena transportadora de electrones (ETC, por sus siglas en inglés "*Electron Transport Chain*") y la fosforilación oxidativa, 22 corresponden a tRNAs y 2 a rRNAs (Whelan & Zuckerbraun, 2013). Por lo tanto, la función oxidativa de las mitocondrias depende completamente del aporte nuclear, y la gran mayoría de las proteínas mitocondriales son traducidas en el citosol y luego importadas hacia las mitocondrias a través de los complejos TOM (*Translocase of the outer membrane*) y TIM (*Translocase of the inner membrane*) (Baker et al., 2007; Richter-Dennerlein et al., 2015; Ryan & Hoogenraad, 2007; Yun & Finkel, 2014).

1.2.1. Control de calidad mitocondrial

Debido a su estructura y su función en el metabolismo oxidativo, las mitocondrias son organelos expuestos a diversas formas de estrés. Por una parte, la mitocondria es una de las principales fuentes de generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), derivadas del funcionamiento de la ETC (Andreux et al., 2013; Baker & Haynes, 2011). Las cantidades elevadas de ROS pueden afectar el funcionamiento mitocondrial al oxidar proteínas, lípidos y mtDNA (Andreux et al., 2013; Baker & Haynes, 2011; Kotiadis et al., 2013). Por otra parte, la mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en el genoma nuclear, lo que implica que éstas deben ser importadas, en su forma desplegada, a través de los complejos de importe de proteínas y luego deben ser correctamente plegadas y ensambladas (Andreux et al., 2013; Baker et al., 2007; Broadley & Hartl, 2008; Jovaisaite et al., 2014). Además, los complejos I, III, IV y la ATP sintasa de la cadena transportadora de electrones poseen subunidades codificadas tanto por el genoma nuclear como el mitocondrial (Andreux et al., 2013; Haynes & Ron, 2010; Pellegrino et al., 2013). El ensamblaje de estos complejos requiere de cantidades estequiométricas de todas las subunidades, lo cual implica que debe existir una coordinación precisa en la expresión de ambos genomas (Andreux et al., 2013; Haynes & Ron, 2010; Kotiadis et al., 2013; Pellegrino et al., 2013; Rampelt & Pfanner, 2016; Richter-Dennerlein et al., 2016). Todos estos factores pueden jugar un rol en la alteración de la proteostasis dentro de la mitocondria.

Debido a la importancia de mantener el buen funcionamiento de las mitocondrias para conservar la homeostasis celular, existen diversos mecanismos de control de calidad que operan en este organelo, los cuales actúan dependiendo de la extensión del daño y del tiempo de exposición al agente estresor (**Figura 2**) (Andreux et al., 2013; Baker et al., 2011; Baker & Haynes, 2011; Kornmann, 2014; Kotiadis et al., 2013). De acuerdo a este esquema, la mantención de la homeostasis proteica es el primer paso para asegurar la función mitocondrial (Andreux et al., 2013; Baker et al., 2011; Baker & Haynes, 2011). Es así que la maquinaria para la mantención de la proteostasis mitocondrial incluye diversas chaperonas moleculares y proteasas, que se encuentran distribuidas en cada uno de los compartimentos mitocondriales (Baker et al., 2011; Baker & Haynes, 2011;

Kotiadis et al., 2013; Pellegrino et al., 2013). Cuando se producen alteraciones en la ETC, que conllevan un aumento en la producción de ROS, existen programas de defensa antioxidantes que comprenden diversas enzimas con función antioxidante y de reparación del mtDNA (Andreux et al., 2013; Kotiadis et al., 2013). Si el daño se hace extensivo a una mayor porción del organelo, una forma de disminuir el daño es a través de la dinámica mitocondrial.

Las mitocondrias no son entidades estáticas dentro de las células, sino que conforman una red que es remodelada por eventos de fusión y fisión, proceso conocido como dinámica mitocondrial (Chan, 2006; Pernas & Scorrano, 2016). La fusión de una mitocondria deteriorada con una mitocondria sana limita la extensión del daño al permitir la complementación de sus componentes (Andreux et al., 2013; Ashrafi & Schwarz, 2013; Osiewacz & Bernhardt, 2013; Youle & van der Bliek, 2012). Por otra parte, cuando una porción significativa de la red mitocondrial está severamente dañada, se produce una fisión asimétrica de ésta, acumulando el material deteriorado en unidades que son separadas del resto de la red mitocondrial. Estas mitocondrias dañadas producidas por fisión se caracterizan por tener un menor potencial de membrana mitocondrial ($mt\Delta\psi$) y usualmente son degradadas mediante una forma especializada de macroautofagia, conocida como mitofagia (Andreux et al., 2013; Ashrafi & Schwarz, 2013; Kornmann, 2014; Osiewacz & Bernhardt, 2013; Twig et al., 2008; Youle & van der Bliek, 2012).

La macroautofagia es un proceso conservado en células eucariontes mediante el cual se secuestra contenido citoplasmático y organelos dentro de vesículas de doble membrana que luego se fusionan con lisosomas para su degradación (Mizushima & Komatsu, 2011). La macroautofagia participa en el control de calidad celular, degradando componentes dañados o que ya han cumplido su vida útil, y como respuesta adaptativa a la privación de nutrientes (Yang & Klionsky, 2010). A grandes rasgos, se puede clasificar la macroautofagia en dos tipos: no selectiva, la cual ocurre en situaciones de limitación de nutrientes; y cargo-específica, que se encarga de degradar principalmente organelos envejecidos o que no son necesarios, proceso fundamental para el control de calidad celular (Youle & Narendra, 2011). Dentro de este último tipo de macroautofagia, el caso mejor estudiado es la mitofagia, o autofagia selectiva de mitocondrias (Andreux et al., 2013; Youle & Narendra, 2011; Zhu et al., 2013).

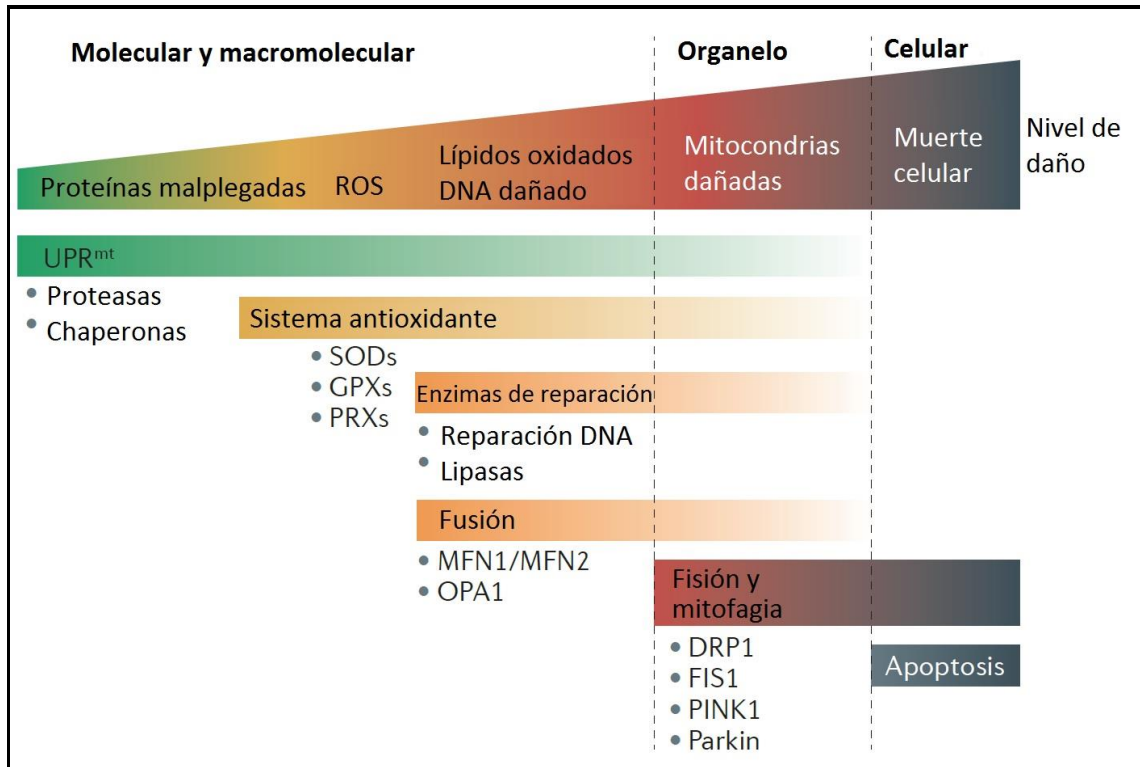


Figura 2. Control de calidad mitocondrial. Esquema que representa las etapas involucradas en el control de calidad mitocondrial. Cuando hay acumulación de proteínas mal plegadas en la mitocondria, la proteostasis se mantiene gracias a la activación de la UPR^{mt}. Si hay niveles elevados de ROS, la homeostasis puede recuperarse gracias a la acción de diversas enzimas antioxidantes. Cuando hay daño oxidativo de proteínas, lípidos y/o mtDNA, éste puede mitigarse gracias a eventos de fusión con mitocondrias sanas. Si estos mecanismos son insuficientes para restaurar la homeostasis mitocondrial, existe una caída del mt $\Delta\psi$, llevando a fisión mitocondrial y mitofagia. Finalmente, cuando el daño se extiende a gran parte de la red mitocondrial, se gatilla la apoptosis de la célula. Adaptado de Andreux et al., 2013.

La mitofagia es uno de los principales mecanismos de control de calidad de las mitocondrias, ya que se encarga de eliminar las mitocondrias defectuosas con bajo mt $\Delta\psi$ (Andreux et al., 2013; Ashrafi & Schwarz, 2013; Kornmann, 2014; Youle & Narendra, 2011). Las proteínas PINK1 y Parkin son los principales componentes de la maquinaria encargada de marcar las mitocondrias destinadas a mitofagia. PINK1 es una proteína quinasa que posee una secuencia de destinación mitocondrial. En condiciones normales,

PINK1 se internada en la mitocondria donde se degrada por diversas proteasas mitocondriales (Deas et al., 2011; Jin et al., 2010; Thomas et al., 2014). Cuando existe un bajo $mt\Delta\psi$, PINK1 se estabiliza en la OMM y recluta a la E3-ubiquitin ligasa Parkin, la cual ubiquitina a diversas proteínas de la OMM, gatillando el reclutamiento de la maquinaria autofágica (Kotiadis et al., 2013; Narendra et al., 2010; Thomas et al., 2014; Youle & Narendra, 2011). Finalmente, cuando el daño ya se ha extendido a la mayor parte de las mitocondrias de una célula, se activa la vía apoptótica con el fin de eliminar la célula completa (Andreux et al., 2013; Barbour & Turner, 2014).

1.2.2. UPR mitocondrial

Como se mencionó anteriormente, la acumulación de proteínas mal plegadas en el interior de las mitocondrias gatilla la activación de una vía de señalización conocida como UPR^{mt} (Yoneda et al., 2004). Hoogenraad *et al.* fueron los primeros en describir el aumento en la transcripción de chaperonas mitocondriales en respuesta a distintos tipos de estrés, como la pérdida del mtDNA (Martinus et al., 1996) o la acumulación artificial de proteínas mal plegadas (Zhao et al., 2002) en células de mamíferos. Posteriormente, estos mismos investigadores describieron algunos factores transcripcionales involucrados en esta respuesta (Aldridge et al., 2007; Horibe & Hoogenraad, 2007). Sin embargo, el grupo de Ron y Haynes, junto con aportes del grupo de Dillin, se ha encargado mayoritariamente de describir la vía de señalización que va desde la detección de la señal de estrés por proteínas mal plegadas hasta la activación de factores transcripcionales de respuesta, utilizando el modelo de *Caenorhabditis elegans* (Baker et al., 2012; Benedetti et al., 2006; Haynes et al., 2007, 2010; Merkwirth et al., 2016; Nargund et al., 2012; Tian et al., 2016; Yoneda et al., 2004). Gracias a estos estudios, hoy en día se conoce gran parte de la secuencia de eventos que participan en la activación de la UPR^{mt} en este modelo (**Figura 3**).

De acuerdo a los trabajos de Ron y Haynes, la señal de estrés se origina en la matriz mitocondrial cuando existe un exceso de proteínas mal plegadas o subunidades que no están siendo ensambladas en sus respectivos complejos. Dichas proteínas saturan a las chaperonas mitocondriales y por tanto se acumulan en la matriz mitocondrial (Haynes et

al., 2013; Jovaisaite et al., 2014; Jovaisaite & Auwerx, 2015). Este exceso de proteínas se degrada por el complejo proteolítico ClpXP (Haynes et al., 2007, 2010) hasta formar péptidos de 6 a 20 residuos (Haynes et al., 2010; Kirstein-Miles & Morimoto, 2010). Estos péptidos luego son transportados hacia el IMS a través de un transportador de tipo ABC (*ATP-binding cassette*), llamado HAF-1, que se localiza en la IMM, y posteriormente difunden a través de la OMM hacia el citosol (Haynes et al., 2010). Se postula que el eflujo de péptidos desde la matriz mitocondrial hacia el citosol altera el importe de proteínas a través del complejo TOM (Haynes et al., 2013; Jovaisaite et al., 2014; Nargund et al., 2012). ATFS-1 es un factor transcripcional del tipo bZip que contiene en su secuencia señales de destinación tanto nuclear como mitocondrial y es fundamental en la expresión de genes asociados a UPR^{mt} (Nargund et al., 2012, 2015; Rauthan et al., 2013). En condiciones basales, ATFS-1 es importado hacia la mitocondria donde es degradado por la proteasa LON (Nargund et al., 2012). Sin embargo, en condiciones de estrés mitocondrial, donde se afecta el importe de proteínas mitocondriales, ATFS-1 se acumula en el citosol y se transloca al núcleo donde activa la expresión de genes relacionados con la proteostasis mitocondrial (Jovaisaite et al., 2014; Nargund et al., 2012; Vögtle & Meisinger, 2012). No obstante, parte de ATFS-1 permanece en la matriz mitocondrial, donde limita la expresión de genes mitocondriales, permitiendo equiparar la expresión de ambos genomas en situaciones de estrés (Nargund et al., 2015). Existen otras proteínas relacionadas con la respuesta nuclear frente a proteínas mal plegadas en la mitocondria. Cuando se induce la UPR^{mt}, aumenta la expresión de UBL-5 (Benedetti et al., 2006), la cual forma un complejo con DVE-1 (Haynes et al., 2007). Este complejo es translocado al núcleo, donde participa en la expresión de genes de la UPR^{mt}, probablemente remodelando la cromatina (Benedetti et al., 2006; Haynes et al., 2007; Jovaisaite et al., 2014). También se ha descrito la participación de dos desmetilasas de histonas que favorecerían la expresión de genes relacionados con la proteostasis mitocondrial y los efectos a largo plazo en la longevidad, de manera epigenética (Merkwirth et al., 2016).

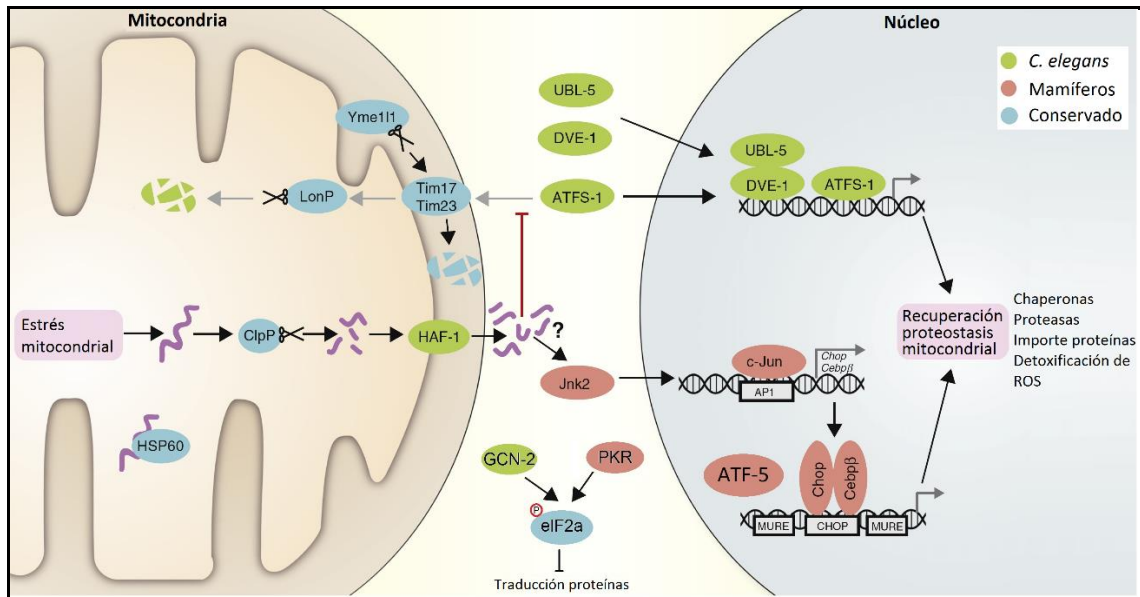


Figura 3. Vía de señalización de la UPR^{mt}. Esquema que representa las etapas involucradas en la activación de la UPR^{mt} en *C. elegans* (en verde), en mamíferos (en rojo) y los elementos conservados entre ambos (en celeste). Adaptado de Jovaisaite & Auwerx, 2015.

A pesar de todos los avances en *C. elegans*, en mamíferos la vía de señalización de la UPR^{mt} aún no está bien descrita. El primer trabajo en esta área mostró, en una línea celular de hepatoma de rata, que la depleción del mtDNA mediante el tratamiento con bromuro de etidio, aumentaba la expresión de chaperonas mitocondriales (Martinus et al., 1996). En un trabajo posterior del mismo grupo, se generó un modelo de inducción de UPR^{mt} mediante la expresión de una forma mutante de la Ornitina transcarbamilasa (OTC), que se localiza en la matriz mitocondrial (Zhao et al., 2002). Esta mutación corresponde a la deleción de los aminoácidos 30-114 de la OTC, que corresponde a parte del sitio activo de la enzima (esta forma mutante se conoce como Δ OTC) (Zhao et al., 2002). Esta proteína puede ser importada a la matriz mitocondrial, pero una vez dentro no se pliega correctamente y forma agregados proteicos insolubles (Zhao et al., 2002). La expresión de esta proteína mutante en células COS-7 activa la UPR^{mt}, aumentando la expresión de chaperonas y proteasas mitocondriales. Asimismo, en este trabajo se descubrió un elemento de respuesta a estrés mitocondrial (MSR, *Mitochondrial stress response*) en los promotores de genes que responden a UPR^{mt}, y

se describió la regulación de este elemento de respuesta por el heterodímero formado por el factor transcripcional CHOP y el cofactor C/EBP β , los cuales aumentan su expresión en estas condiciones (Aldridge et al., 2007; Horibe & Hoogenraad, 2007; Zhao et al., 2002). CHOP y C/EBP β también participan en la UPR^{RE}, sin embargo existen otros factores que dan especificidad a ambas respuestas, ya que al inducir UPR^{mt} no se activan los genes relacionados con la UPR^{RE} (Jovaisaite et al., 2014; Zhao et al., 2002). Algunos estudios sugieren que en la UPR^{mt} en mamíferos también existe participación del complejo ClpXP (Al-Furoukh et al., 2015; Rath et al., 2012). Además, se han descrito otros dos elementos de respuesta conservados en los genes relacionados con UPR^{mt} en mamíferos, denominados MURE1 y MURE2 (*Mitochondrial Unfolded protein Response Elements*), sin embargo aún se desconoce qué factores transcripcionales actúan sobre ellos (Aldridge et al., 2007). Una posible alternativa es el factor ATF-5, descrito recientemente como participante en la UPR^{mt} (Fiorese et al., 2016). Al igual que ATFS-1 en *C. elegans*, ATF-5 posee señales de destinación tanto mitocondrial como nuclear y es regulada igualmente mediante su localización subcelular (Fiorese et al., 2016). Además, ATF-5 restaura la respuesta frente a estrés mitocondrial en nematodos deficientes en ATFS-1, revelando la alta conservación de esta respuesta durante la evolución (Fiorese et al., 2016).

1.3. Mitohormesis

El concepto de hormesis se utiliza ampliamente en el área de toxicología y farmacología (Calabrese & Baldwin, 2002). En términos sencillos, la hormesis se refiere al fenómeno de dosis-respuesta que se produce frente a distintos niveles de estrés, en donde un agente estresor en dosis bajas puede proteger frente a un estímulo posterior con una dosis mayor del mismo estresor (Calabrese & Baldwin, 2002; Yun & Finkel, 2014). La hormesis se explica por la respuesta adaptativa que gatilla un estresor a dosis bajas y que aumenta la capacidad de las células para lidiar con el estrés (Yun & Finkel, 2014).

En los últimos años, ha sido acuñado el concepto de hormesis mitocondrial o mitohormesis. La mitohormesis se refiere a la respuesta hormética gatillada por el estrés

mitocondrial leve, la cual puede producir beneficios metabólicos a corto plazo y efectos a largo plazo, como la resistencia al estrés y el aumento de la longevidad (Barbour & Turner, 2014; Kotiadis et al., 2013; Yun & Finkel, 2014).

La acumulación de proteínas mal plegadas dentro de la mitocondria es una de las primeras señales de estrés mitocondrial (**Figura 2**) (Andreux et al., 2013). De esta forma, se ha descrito en la literatura que la UPR^{mt}, al ser una respuesta adaptativa a niveles bajos de estrés, tiene un efecto hormético que se traduce en un aumento de la longevidad (Karpac & Jasper, 2013; Wolff & Dillin, 2013; Wrighton, 2013). Una serie de estudios han mostrado que la disminución de los niveles de las subunidades de los complejos de la ETC o de la maquinaria de traducción mitocondrial, genera el llamado “desbalance mitonuclear”, e incrementa la esperanza de vida del organismo, dependiente de la activación de la UPR^{mt}, en modelos tales como *C. elegans* y *Drosophila melanogaster* (Copeland et al., 2009; Dillin et al., 2002; Durieux et al., 2011; Houtkooper et al., 2013; Owusu-Ansah et al., 2013). Además, se mostró que la rapamicina y el resveratrol, conocidos por alargar la esperanza de vida en ciertos modelos, inducen igualmente dicho desbalance mitonuclear y, al menos en el caso de la rapamicina, se requiere de la inducción de la UPR^{mt} para lograr el efecto en la sobrevivencia en *C. elegans* (Houtkooper et al., 2013). Asimismo, se ha observado una correlación negativa entre la expresión de la proteína ribosomal mitocondrial S5 y la esperanza de vida en una población genéticamente heterogénea de ratones, lo cual se explicaría por el desbalance mitonuclear generado por la menor traducción mitocondrial, gatillando una respuesta adaptativa que se traduciría en un aumento de la longevidad (Houtkooper et al., 2013). Este estudio además revela que esta vía de longevidad es conservada a lo largo de la evolución.

Estos antecedentes indican que la correcta ejecución de la UPR^{mt} es vital para aumentar la resistencia de las mitocondrias, y por tanto de las células, frente a distintos tipos de estrés. Para lograr esto se requiere una correcta señalización desde la mitocondria hacia el núcleo, para activar la expresión de los genes necesarios para recuperar la homeostasis proteica (Jovaisaite & Auwerx, 2015; Whelan & Zuckerbraun, 2013). Sin embargo, se debe tener en cuenta que, como toda respuesta adaptativa, la UPR^{mt} requiere además de un aporte energético que sustente el despliegue de dicha

respuesta, ya que todos los procesos involucrados requieren de un mayor aporte de ATP (generación de la señal de estrés, expresión génica, acción de transportadores, chaperonas y proteasas). Tanto la modulación de la expresión génica como la potenciación del metabolismo mitocondrial se basan en un proceso conocido como comunicación entre organelos, que se detallará a continuación.

1.4. Comunicación entre organelos

Las células eucariontes se caracterizan por la separación de distintas funciones celulares en diferentes organelos. A pesar de que originalmente se pensaba que estos organelos eran entidades independientes, delimitadas en su mayoría por membranas, en la actualidad es ampliamente aceptado el concepto de la comunicación entre organelos como parte fundamental de su funcionamiento (Bravo-Sagua et al., 2014). La comunicación entre organelos es un proceso dinámico en el tiempo y el espacio, que puede estar mediado por moléculas de señalización que son enviadas desde un organelo a otro o que puede producirse por el acercamiento físico entre dos organelos a distancias menores de 40 nm, pero sin perder su individualidad ni fusionar sus membranas. Estos contactos físicos generalmente están mediados por complejos proteicos que regulan las interacciones y el traspaso de componentes entre organelos (Bravo-Sagua et al., 2014). En los últimos años nuestro laboratorio se ha dedicado al estudio de la comunicación entre organelos y su participación en diversos procesos fisiopatológicos (Bravo-Sagua et al., 2013, 2014, 2016, Bravo et al., 2011, 2012; del Campo et al., 2014; Gutiérrez et al., 2014; Ibarra et al., 2013).

1.4.1. Comunicación mitocondria-núcleo

Como se mencionó anteriormente, el proteoma mitocondrial se encuentra codificado en dos genomas separados, lo cual implica que, para el correcto funcionamiento de este organelo, debe existir una expresión finamente coordinada de ambos conjuntos de genes. Es por esto que la comunicación entre el núcleo y las mitocondrias es fundamental para mantener la homeostasis mitocondrial y celular (Kotiadis et al., 2013; Quirós et al., 2016; Ryan & Hoogenraad, 2007; Whelan & Zuckerbraun, 2013; Wolff,

Ladoukakis, Enriquez, et al., 2014). Originalmente se pensaba que la comunicación entre el núcleo y las mitocondrias era unidireccional, es decir, que el único traspaso de información ocurría durante la biogénesis mitocondrial, en donde las proteínas mitocondriales codificadas en el genoma nuclear eran importadas hacia el organelo (Kotiadis et al., 2013; Ryan & Hoogenraad, 2007; Whelan & Zuckerbraun, 2013). Sin embargo, actualmente se reconoce que las mitocondrias señalizan en forma inversa hacia el núcleo en situaciones de estrés con el fin de regular la expresión de genes necesarios para gatillar respuestas adaptativas. Este tipo de señalización desde la mitocondria hacia el núcleo se conoce de forma genérica como señalización retrógrada (Kotiadis et al., 2013; Quirós et al., 2016; Ryan & Hoogenraad, 2007; Whelan & Zuckerbraun, 2013).

La UPR^{mt} es un tipo de señalización retrógrada que se gatilla cuando existe una alteración en la proteostasis mitocondrial. Como se indicó anteriormente, la UPR^{mt} genera como respuesta la expresión de genes nucleares que ayudan a lidiar con el estrés proteotóxico, principalmente chaperonas moleculares y proteasas mitocondriales (Kotiadis et al., 2013; Quirós et al., 2016; Ryan & Hoogenraad, 2007; Whelan & Zuckerbraun, 2013).

1.4.2. Comunicación mitocondria-RE

Los contactos entre mitocondrias y RE se producen en zonas especializadas de la membrana del RE conocidas como “membrana del RE asociada a mitocondrias” (MAM, por sus siglas en inglés “*Mitochondrial-Associated ER Membrane*”) (Bravo-Sagua et al., 2013; López-Crisosto et al., 2015). Estos contactos son esenciales en procesos de biosíntesis y traspaso de lípidos, regulación de la dinámica mitocondrial y traspaso de Ca²⁺ desde el RE hacia la mitocondria (Bravo-Sagua et al., 2013, 2014; Bravo et al., 2012; Csordás & Hajnóczky, 2009; Rowland & Voeltz, 2012). La maquinaria proteica encargada de mantener y regular las MAMs ha sido ampliamente descrita, e incluye proteínas tales como Mitofusina-2, IP₃R, VDAC y mtHsp70/Grp75 (**Figura 4, izquierda**) (Bravo-Sagua et al., 2013; Giorgi et al., 2009; Kornmann, 2013; López-Crisosto et al., 2015).

El metabolismo mitocondrial basal requiere de sustratos metabólicos en forma de equivalentes reducidos (NADH, FADH₂), oxígeno como aceptor final de la ETC y Ca²⁺ como cofactor para el óptimo funcionamiento de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs (Bravo-Sagua et al., 2017; Bravo et al., 2012; Cárdenas et al., 2010; Rizzuto et al., 2012). El Ca²⁺ ingresa a la matriz mitocondrial mediante un complejo conocido como uniporter de Ca²⁺ mitocondrial (mCU, por sus siglas en inglés *mitochondrial Calcium Uniporter*) (Kamer & Mootha, 2015; De Stefani et al., 2011). El mCU es altamente selectivo para Ca²⁺, sin embargo tiene una baja afinidad por este catión (Giorgi et al., 2009; Kirichok et al., 2004). Es por esto que se requieren altas concentraciones de Ca²⁺ en los alrededores de la mitocondria para lograr un ingreso eficiente de Ca²⁺ (Bravo-Sagua et al., 2017). Estas altas concentraciones de Ca²⁺ se producen en las cercanías del RE, uno de los principales reservorios de Ca²⁺ intracelular, por lo tanto los contactos RE-mitocondria son fundamentales para lograr un traspaso eficiente de Ca²⁺ a la mitocondria y su correcto funcionamiento (**Figura 4, derecha**) (Bravo-Sagua et al., 2017; Bravo et al., 2012; Cárdenas et al., 2010; Giorgi et al., 2009; Rizzuto et al., 2012).

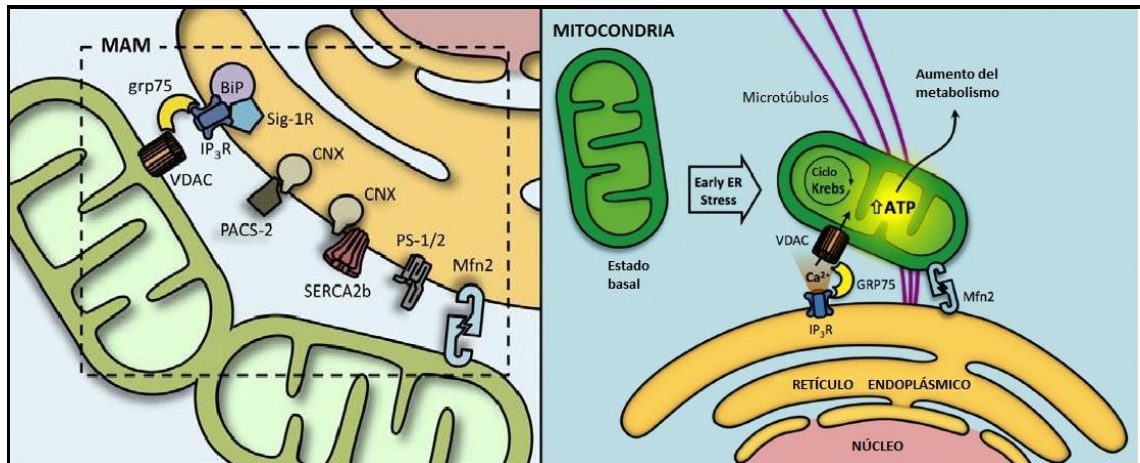


Figura 4. Comunicación entre mitocondrias y RE. (Izquierda) Esquema que representa la estructura de la MAM y algunas de las proteínas que la componen (Adaptado de Bravo-Sagua et al., 2013). (Derecha) Esquema que representa la potenciación del metabolismo mitocondrial que se produce al aumentar los contactos entre mitocondrias y RE, con el consecuente aumento en el traspaso de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial. Adaptado de Bravo et al., 2012.

1.4.3. Comunicación mitocondria-RE durante estrés celular

En situaciones de estrés celular, como ocurre cuando existe una acumulación de proteínas mal plegadas, existe un incremento en los requerimientos energéticos para poder poner en marcha las correspondientes respuestas adaptativas. Es así como nuestro Laboratorio ha estudiado previamente la adaptación metabólica frente al estrés de RE (Bravo et al., 2011, 2012). En etapas tempranas del estrés de RE en células HeLa, incluso antes de observar cambios en la expresión de genes, se produce un aumento en los contactos entre el RE y las mitocondrias. Esto conlleva un aumento en el traspaso de Ca^{2+} hacia las mitocondrias, produciendo, a su vez, un aumento en el metabolismo mitocondrial (Bravo et al., 2011). Este resultado sugiere que para ejecutar una respuesta de adaptación al estrés, no sólo se requiere de cambios en la expresión génica, sino también de ajustes metabólicos que aporten la energía suficiente para superar dicho estrés (Bravo et al., 2012). Más aún, si se inhibe el traspaso de Ca^{2+} desde el RE hacia la mitocondria, se observa un aumento en la muerte celular frente al estrés de RE,

destacando la importancia de la adaptación metabólica como parte de la respuesta de UPR^{RE} (Bravo et al., 2011).

Con respecto a las adaptaciones metabólicas frente a una situación de UPR^{mt}, éstas sólo han sido estudiadas a largo plazo, cuando el daño mitocondrial es evidente. En estos casos se observa un incremento en la expresión de genes glicolíticos y una reducción en el metabolismo mitocondrial (Lin & Haynes, 2016; Nargund et al., 2012; Schulz & Haynes, 2015). Actualmente, no existen antecedentes en la literatura acerca del estudio de las potenciales adaptaciones metabólicas tempranas y los contactos entre mitocondrias y RE en situaciones de UPR^{mt}. En base a estos antecedentes, en el presente proyecto se propuso evaluar los cambios en la comunicación mitocondrias-RE en un contexto de estrés mitocondrial.

2. HIPÓTESIS

“La activación del mecanismo de respuesta a proteínas mal plegadas mitocondrial (UPR^{mt}), inducido por doxiciclina, aumenta el metabolismo de este organelo y su contacto funcional con el retículo endoplásmico”.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios en el metabolismo mitocondrial y el acercamiento mitocondria-retículo endoplásmico producidos por la activación de la UPR^{mt} por doxiciclina en células HeLa.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el curso temporal de la activación de la UPR^{mt} por doxiciclina en células HeLa.
- Estudiar los cambios en el metabolismo mitocondrial generados por la activación de la UPR^{mt} por doxiciclina en células HeLa.
- Evaluar si existen cambios en la comunicación física y funcional entre mitocondrias y retículo endoplásmico por la activación de la UPR^{mt} por doxiciclina en células HeLa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio DMEM (D1152-50L), medio Earle's Balanced Salt Solution (EBSS E2888), doxiciclina (D9891), yoduro de propidio (PI, P4170), RNasa (R6513), carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP, C2759), carbonil cianuro 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP, C2920), histamina (H7250). El cocktail inhibidor de proteasas cOmplete™ Mini (11 836 170 001) y el cocktail inhibidor de fosfatasa PhosSTOP (04 906 837 001) se adquirieron en Roche Applied Science (Pleasanton, Ca, EEUU). De Abcam (Cambridge, Reino Unido) se obtuvieron los anticuerpos anti-MTCO1 (ab90668), anti-SDHA (ab137040) y anti-calnexina (ab75801). Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo (401315) y ratón (402335) conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). El kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (G7571) se obtuvo de Promega (Madison, WI, EEUU). El kit Plasmid Maxi Kit (12162) se adquirió en QIAGEN (Hilden, Alemania). De Alomone Labs (Jerusalem, Israel) se obtuvo la oligomicina (O-500). El agua grado biología molecular (17012-200) se obtuvo de MO BIO Laboratories, Inc (Carlsbad, CA, EEUU). De Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, EEUU) se adquirió el paraformaldehído 16% (15710). De Life technologies (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo medio RPMI (11879-020), medio Opti-MEM (31985-070), piruvato de sodio (11360), azul de tripán (15250-061), Trizol (15596018), TMRM (T668) y medio de montaje ProLong con DAPI (P36935). El reactivo quimioluminiscente para Western Blot EZ-ECL (20-500-1000), el suero fetal bovino (FBS, 04-127-1A), y la tripsina 10X (03-051-5B) se adquirieron en Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). De Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EEUU) se obtuvieron los anticuerpos secundarios fluorescentes Alexa anti ratón y conejo (A-11036 y A-11029), el anticuerpo anti-mtHsp70 (MA3-028), el PowerUp SYBR Green Master Mix (A25742) y la lipofectamina 3000 (L3000-008). La albúmina de suero bovino (BSA, BM-0150) se adquirió en Winkler Ltda. (Santiago, Chile). De BioRad (Hercules, CA, EEUU) se obtuvieron el reactivo de Bradford (500-0006), las membranas de nitrocelulosa (1620115), 5x iScript RT Supermix

(1708840). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

Adicionalmente, en este trabajo se utilizaron los siguientes plásmidos:

- pLVX-Puro mitoKeima (Shirakabe et al., 2016; Sun et al., 2015), obtenido del Dr. Toren Finkel, EEUU, con autorización del Dr. Atsushi Miyawaki, Japón.
- Split GFP (pcDNA3 OMM GFP_{β1-10}; pDEST ER GFP_{β11} short; pDEST ER GFP_{β11} long; pDEST Cytosolic GFP_{β11} + RFP) (Granatiero et al., 2016), obtenidos del Dr. Gyorgy Szabadkai, UK.
- pCMV CEPIA2mt (Suzuki et al., 2014), obtenido de la Dr. Cecilia Hidalgo, Chile. (kD para Ca²⁺ = 0,16 μM)
- pCMV-mitoGCaMP6m (Hailong et al., 2014), obtenido del Dr. Enrique Jaimovich, Chile.

5.2. Cultivo celular

Para la ejecución de esta tesis se utilizó como modelo experimental cultivos celulares de la línea derivada de cáncer cervical HeLa, obtenidas desde ATCC (American Type Culture Collection, EEUU). Para la realización de los experimentos, las células se utilizaron entre los pasajes 3 al 12, considerados a partir del vial obtenido desde ATCC. Las células se mantuvieron en medio de cultivo DME suplementado con 10% FBS y 1 mM piruvato de sodio, en una incubadora a 37 °C y atmósfera húmeda con 5% CO₂ y 95% aire. El cultivo se realizó bajo condiciones de esterilidad, manipulando las células en una campana de flujo laminar. Las células se sembraron en placas de 100 mm a baja confluencia para permitir su proliferación.

5.3. Conteo de células viables mediante azul de tripán

Las placas de cultivo de 100 mm se dejaron crecer hasta lograr la confluencia deseada según el número de células requeridas (60-90%). Una vez alcanzada esta confluencia, las células se lavaron con solución de PBS y se agregó 1 mL de solución de tripsina 1X

durante 5 min a 37 °C para soltar las células, deteniendo la reacción con 1 a 4 mL de DMEM 10% FBS, para luego traspasar a un tubo de 15 mL. De esta suspensión de células se tomaron 20 µL en un tubo Eppendorf y se agregaron 20 µL de azul de tripán al 0,4% en PBS. La mezcla se introdujo en una cámara de Neubauer para el conteo celular. Por cada placa se contaron las células viables en 8 cuadrantes distintos, y se calculó el número de células mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de células} \left(\frac{\text{número}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Promedio de células por cuadrante} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de la cámara}}$$

Para el cálculo se consideró un factor de dilución de 2 y un volumen de la cámara de 0,0001 mL.

5.4. Estímulo con doxiciclina

La solución stock de doxiciclina se preparó a una concentración de 15 ó 30 mg/mL según necesidad, disolviendo la doxiciclina en agua nano-pura estéril y guardando alícuotas de esta solución a -20 °C. Una vez en uso, cada alícuota se guardó a 4 °C por un máximo de 4 días. Los estímulos con doxiciclina se realizaron a concentraciones finales de 15 ó 60 µg/mL durante un tiempo variable entre 2 y 72 h, según lo indicado en cada experimento.

5.5. Preparación de extractos proteicos totales

Las células se sembraron en placas de 60 mm a una confluencia del 50% inicial. Al día siguiente del sembrado se comenzaron los estímulos con doxiciclina de 24, 48 y 72 h. Una vez finalizado los estímulos, las células se lavaron tres veces con solución de PBS fría y luego se lisaron con 60 µL de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1%; tritón X-100 1% v/v) suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasa. El homogenizado se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 16.500 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante o

extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo y se determinó su concentración por el método de Bradford (Bradford, 1976). Finalmente, el extracto se desnaturó a 95 °C por 5 min en tampón SDS-PAGE 4x, para ser almacenado posteriormente a -20 °C.

5.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos, se cargaron 30 µg de extracto proteico total. El gel concentrador se preparó al 3% y el separador al 10% de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%) a un voltaje constante de 80 V durante 30 min y luego a 100 V hasta el final de la corrida electroforética. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm a amperaje constante de 400 mA por 90 min en tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM).

5.7. Western blot

Una vez realizada la electrotransferencia, las membranas se trataron con tampón de bloqueo (TBS 1x; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-MTCO1 (dilución de 1:1.000), anti-SDHA (dilución de 1:6.000) o anti-β-tubulina (dilución de 1:5.000) en tampón de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1 %; leche descremada 5% p/v) toda la noche a 4°C y con agitación suave. Luego, las membranas se lavaron durante 15 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1%, y se incubaron durante 1,5-2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG correspondiente conjugado con peroxidasa de rabanito a una dilución de 1:5.000 en tampón de incubación. Para la detección, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL y se digitalizaron mediante el sistema de captura de imágenes Dyversity 4 (Syngene). La densitometría de las imágenes se realizó mediante el programa computacional USI Scan.

5.8. Extracción del RNA total

Las células se sembraron en placas de 60 mm a una confluencia del 50% inicial. Al día siguiente del sembrado se comenzaron los estímulos con doxiciclina de 24, 48 y 72 h. Una vez finalizado los estímulos, las células se lavaron tres veces con solución de PBS fría filtrada y luego se agregó 1 mL de Trizol, rescatando el lisado en un tubo Eppendorf estéril. Luego de incubar por 5 min en hielo, se agregó 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15-30 seg para después dejar reposar por 3 min en hielo. Las muestras se centrifugaron a 12.000g por 15 min a 4 °C y se rescató la fase acuosa superior cuidadosamente, traspasando a un tubo Eppendorf estéril nuevo. Se agregó 500 μ L de isopropanol, se agitó suavemente y se incubó en hielo durante 10 min. Se centrifugó nuevamente a 12.000g por 10 min a 4 °C y se removió cuidadosamente todo el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con 1 mL de etanol 75% frío (diluido con agua libre de nucleasas), agitando vigorosamente y volviendo a centrifugar a 12.000g por 5 min a 4 °C. Se eliminó todo el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 20 μ L de agua libre de nucleasas. El RNA extraído se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

5.9. Reacción de retrotranscripción

Para la reacción de retrotranscripción se utilizó el kit 5x iScript RT Supermix (BioRad) según las instrucciones del fabricante. De cada muestra se tomó el volumen necesario del extracto de RNA para tener 1 μ g de RNA total, se agregó 4 μ L del mix y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para completar 20 μ L. La reacción de retrotranscripción se realizó en un termociclador Gene Cyler (BioRad) siguiendo el siguiente protocolo: 5 min a 25 °C, 30 min a 42 °C y 5 min a 85 °C. El DNAc obtenido se almacenó a -20 °C.

5.10. Validación de partidores para qPCR

Para estandarizar la concentración de partidores y de DNAc para la reacción de PCR cuantitativo (qPCR) y calcular la eficiencia de la reacción, se realizó una validación de

cada par de partidores utilizados en este trabajo. Para comenzar se eligió una concentración inicial de partidores (entre 200 y 500 nM) y se tomó una muestra representativa de DNAC de la cual se prepararon 5 diluciones seriadas de 1:5 para realizar la curva de concentraciones. Para la reacción de qPCR se utilizó el mix comercial PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), según las indicaciones del fabricante, considerando un volumen final de reacción de 10 μ L (5 μ L Master mix, 1 μ L mezcla de partidores, 3 μ L agua libre de nucleasas, 1 μ L DNAC) y agregando cada punto de la curva en triplicado. Las muestras se corrieron en un equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) en modo “Quantitation – Standard curve”. El protocolo de temperaturas utilizado fue el siguiente: 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de [95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min], más la curva de melting de [95 °C por 15 seg + rampa de temperatura continua de 60 °C a 95 °C]. Para cada par de partidores se obtuvo una curva de ciclo umbral (C_T) versus log [DNAC], la cual se ajustó a una línea recta (con un $r^2 \geq 0,96$) cuya pendiente representa la eficiencia de la reacción. Se consideraron aceptables las eficiencias de reacción entre 90 y 110%. De esta validación se obtuvo la concentración adecuada de partidores, la dilución de DNAC que permite obtener un C_T apropiado (entre 18 y 24 ciclos) y la eficiencia de la reacción para el cálculo semi-cuantitativo del ΔC_T .

Los partidores utilizados en este trabajo de tesis fueron los siguientes:

CHOP (humano)	Sentido	5' CCTCACTCTCCAGATTCCA 3'
	Antisentido	5' AGCCGTTTCATTCTCTTCAG 3'
mtHsp60 (humano)	Sentido	5' TTA CTGCTGTCATTGTCCAT 3'
	Antisentido	5' GCTGCTTAACTTCTCATCTG 3'
C/EBP β (humano)	Sentido	5' CAGCGACGAGTACAAGAT 3'
	Antisentido	5' CTGCTCCACCTTCTTCTG 3'
ClpP (humano)	Sentido	5' TGGCATCTTAGACAAGGTTC 3'
	Antisentido	5' CACATGATTCTGGAGAGGAG 3'
Hspa5 (humano)	Sentido	5' TCTGGTGATCAAGATACAGG 3'
	Antisentido	5' CTTTCACCTTCATAGACCTTG 3'
Hprt (humano)	Sentido	5' TGCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA 3'
	Antisentido	5' CAACACTTCGTGGGGTCCTTTT 3'

Las concentraciones de partidores validadas, con sus respectivas eficiencias de reacción se muestran a continuación:

Gen	Concentración	Eficiencia	R²
CHOP (humano)	500 nM	100,766	0,966
mtHsp60	500 nM	98,854	0,988
C/EBP β (humano)	500 nM	105,649	0,997
ClpP (humano)	500 nM	96,339	0,997
Hspa5 (humano)	200 nM	100,504	0,963
Hprt (humano)	500 nM	97,593	0,988

5.11. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR) en tiempo real

La reacción de qPCR en tiempo real se realizó considerando la concentración de partidores y la dilución de DNAC obtenidas en la validación previamente descrita. Para la reacción de qPCR se utilizó el mix comercial PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), según las indicaciones del fabricante, considerando un volumen final de reacción de 10 μ L (5 μ L Master mix, 1 μ L mezcla de partidores, 3 μ L agua libre de nucleasas, 1 μ L DNAC) y agregando cada punto de la curva en triplicado. Las muestras se corrieron en un equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) en modo “Quantitation – Comparative C_T ”, siguiendo el mismo protocolo de temperaturas utilizado en la validación de los partidores. La razón de la expresión de un gen determinado versus un gen de referencia se calculó utilizando el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001), siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Razón de expresión} = \frac{(E_{gen\ interés})^{\Delta C_T\ gen\ interés(\text{control-condición})}}{(E_{gen\ referencia})^{\Delta C_T\ gen\ referencia(\text{control-condición})}}$$

Donde E representa la eficiencia de la reacción, ΔC_T es la diferencia de C_T entre el control experimental y la condición de interés, en este caso el estímulo con doxiciclina.

5.12. Ensayo de viabilidad celular con azul de tripán

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos en número de 20×10^3 células/pocillo. Al día siguiente del sembrado se comenzaron los estímulos con doxiciclina de 24, 48 y 72 h, en triplicado. Una vez terminados los estímulos, las células se lavaron tres veces con solución de PBS y se agregaron 250 μ L de solución de tripsina 1X durante 5 min a 37 °C para soltar las células, deteniendo la reacción con 50 μ L de FBS. De esta suspensión de células se tomaron 20 μ L en un tubo Eppendorf y se agregaron 20 μ L de azul de tripán al 0,4% en PBS. El conteo de células viables se realizó siguiendo el protocolo expuesto en el punto 5.3.

5.13. Ensayo de viabilidad celular mediante incorporación de yoduro de propidio

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos en número de 20×10^3 células/pocillo. Al día siguiente del sembrado se comenzaron los estímulos con doxiciclina de 24, 48 y 72 h, en triplicado. Una vez finalizado los estímulos, se colectó el medio de cultivo (1 mL) y las células se lavaron tres veces con solución de PBS fría y se agregaron 300 μ L de solución de tripsina 1X durante 5 min a 37 °C para soltar las células, deteniendo la reacción con 30 μ L de FBS. Las células en suspensión se traspasaron a tubos de citómetro correspondientes junto con el medio de cultivo colectado y se agregó 13 μ L de una solución de yoduro de propidio (PI) 1 mg/mL (excitación 493 nm; emisión 630 nm). La lectura de la fluorescencia se realizó mediante citometría de flujo en un equipo BD Accuri C6, considerando como umbral de fluorescencia aquella emitida por una muestra sin PI y como control positivo de muerte celular una muestra tratada con H₂O₂ 5 mM durante 1 h antes de terminado los estímulos.

5.14. Evaluación de la población subG1 mediante citometría de flujo

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos en número de 20×10^3 células/pocillo. Al día siguiente del sembrado se comenzaron los estímulos con doxiciclina de 24, 48 y 72 h, en triplicado. Una vez finalizado los estímulos, se colectó el medio de cultivo (1 mL) en tubos Eppendorf y las células se lavaron tres veces con solución de PBS fría y se agregaron 300 μ L de solución de tripsina 1X durante 5 min a 37 °C para soltar las células, deteniendo la reacción con 30 μ L de FBS. Las células en suspensión se traspasaron a los tubos Eppendorf correspondientes y se colectaron por centrifugación a 250 g a 4 °C durante 5 min. Luego de eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 mL de metanol absoluto frío y se incubó durante toda la noche a -20 °C para permeabilizar la membrana celular. Al día siguiente, se colectaron las células por centrifugación a 250 g a 4 °C durante 5 min y se resuspendieron en 300 μ L de solución de PBS con RNAsa (50 μ g/mL) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se trasladaron a tubos de citómetro y se agregó 5 μ L de una solución de PI 1 mg/mL (excitación 493 nm; emisión 630 nm). La lectura de la fluorescencia se realizó mediante citometría de flujo en un equipo BD Accuri C6,

considerando como población subG1 todas aquellas células cuya emisión de fluorescencia se encontró bajo la población G1. Como control positivo de apoptosis se utilizó una muestra tratada con sorbitol 300 mM durante 6 h antes de terminados los estímulos.

5.15. Amplificación de plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se amplificaron mediante el cultivo en medio selectivo de bacterias *Escherichia coli* SH5 α competentes transformadas mediante shock térmico. La purificación de los plásmidos se realizó utilizando el Plasmid Maxi Kit (Qiagen) según el protocolo del fabricante.

5.16. Evaluación de la mitofagia mediante el sensor mitoKeima

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro en número de 80×10^3 células/pocillo. Al día siguiente del sembrado se comenzaron los estímulos con doxiciclina de 24, 48 y 72 h, en duplicado. 48 h antes del término de los estímulos, las células se transfectaron con 1 μ g del plásmido mitoKeima (Shirakabe et al., 2016; Sun et al., 2015) utilizando como vector Lipofectamina 3000 en medio Opti-MEM según las indicaciones del fabricante. El medio de transfección se mantuvo durante 4 h y luego se cambió al medio de cultivo habitual, reponiendo los estímulos correspondientes. Al finalizar los estímulos, los cubreobjetos se lavaron con solución tampón Krebs (NaCl 140 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 3,5 mM; MgCl₂ 2 mM; Hepes 10 mM; Glucosa 5,6 mM, pH 7,2-7,4) y se ubicaron en adaptadores para microscopía confocal con 500 μ L de la misma solución. Las células se observaron en un microscopio confocal modelo LSM 700 (Carl Zeiss), registrando la fluorescencia obtenida luego de excitar a 488 y 555 nm.

5.17. Medición de los niveles intracelulares de ATP

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos en número de 20×10^3 células/pocillo. Al día siguiente del sembrado se comenzaron los estímulos con

doxiciclina de 2 y 4 h. Una vez finalizado los estímulos, se removió el medio de la placa y se lavó dos veces con solución de PBS. Luego se agregaron 20 μ L de solución tampón Krebs (NaCl 140 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 3,5 mM; MgCl₂ 2 mM; Hepes 10 mM; Glucosa 5,6 mM, pH 7,2-7,4) y 20 μ L del tampón de lisis del kit Cell Titer-Glo® (Promega). La placa se agitó durante 2 min con el fin de completar la reacción. Posteriormente, el lisado se traspasó a una placa opaca de 96 pocillos y se analizó la luminiscencia en un equipo Glomax Multidetecion System (Promega). Finalmente, los resultados se expresaron como los promedios de medidas normalizadas a las células sin tratamiento o control. Como control de la técnica se utilizó un tratamiento con oligomicina 2 μ M durante 1 h.

5.18. Medición de la velocidad de consumo de O₂ mediante oxigrafía de Clark

Las células se sembraron en placas de cultivo de 60 mm para una confluencia final de 80%. Al día siguiente del sembrado se realizaron los estímulos con doxiciclina de 2 y 4 h. Una vez finalizados los estímulos, las células se lavaron dos veces con solución de PBS a 37 °C y se incubaron con 1 mL de solución de tripsina 1X durante 5 min a 37 °C, deteniendo la reacción con 100 μ L de FBS. Las células en suspensión se traspasaron a tubos Eppendorf, se colectaron por centrifugación a 250 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet de células se resuspendió en 500 μ L de PBS, los cuales se traspasaron a una cámara (volumen final de 600 μ L) acoplada al sistema de electrodos. El consumo de O₂ se registró en un electrodo de Clark Oxygraph Plus System (Hansatech) acoplado a un sistema de registro digital. Las mediciones se realizaron a 25 °C durante al menos 3 min para registrar la respiración basal y luego se agregó CCCP a una concentración final de 200 nM para medir la respiración desacoplada. Una vez finalizada la medición, se recuperó la solución con células para cuantificar proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), con el fin de normalizar las mediciones de consumo de O₂.

5.19. Evaluación del potencial mitocondrial

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro en número de 200 x 10³ células/pocillo. Al día siguiente del sembrado

las células se comenzaron los estímulos con doxiciclina de 2 y 4 h, en duplicado. 30 min antes de finalizar los estímulos, se agregó TMRM al medio de cultivo, a una concentración final de 20 nM. Luego, los cubreobjetos se lavaron con solución tampón Krebs (NaCl 140 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 3,5 mM; MgCl₂ 2 mM; Hepes 10 mM; glucosa 5,6 mM, pH 7,2-7,4) adicionando TMRM 20 nM para mantener el equilibrio y se ubicaron en adaptadores para microscopía confocal con 300 µL de la misma solución. Las células se observaron en un microscopio confocal modelo LSM 700 (Carl Zeiss), registrando en tiempo real la fluorescencia obtenida luego de excitar a 555 nm, durante 50 seg.

5.20. Inmunofluorescencia indirecta

Las células se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos en número de 40×10^3 células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro. Al día siguiente del sembrado se realizaron los estímulos con doxiciclina de 2 y 4 h. Una vez finalizados los estímulos, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1% en PBS (filtrado) durante 1 h. Posteriormente, para determinar la distribución y los contactos entre RE y mitocondrias, las células se incubaron con los anticuerpos anti-Calnexina (para marcar RE, dilución 1:200) y anti-mtHsp70 (para marcar mitocondrias, dilución 1:500) en PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Se lavaron nuevamente con PBS y luego se incubaron por 1 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz con el anticuerpo secundario Alexa 488 o 568, anti IgG de ratón o anti IgG de conejo, según corresponda (dilución 1:600). Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando ProLong con DAPI como medio de montaje, el cual además retarda el decaimiento de la fluorescencia. Posteriormente, las preparaciones se observaron en un microscopio confocal modelo LSM 700 (Carl Zeiss). El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J (NIH, EEUU) como se describe en detalle más adelante.

5.21. Evaluación de los contactos RE-mitocondria mediante el sensor Split-GFP

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro en número de 180×10^3 células/pocillo. Al día siguiente del sembrado las células se transfectaron con el plásmido Split-GFP (1 μg de OMM GFP $_{\beta 1-10}$ + 1 μg de [ER GFP $_{\beta 11}$ short/ER GFP $_{\beta 11}$ long/Cytosolic GFP $_{\beta 11}$ + RFP]) (Granatiero et al., 2016) utilizando como vector Lipofectamina 3000 en medio Opti-MEM según las indicaciones del fabricante. El medio de transfección se mantuvo durante 4 h y luego se cambió al medio de cultivo habitual. Al día siguiente de la transfección se comenzaron los estímulos con doxiciclina de 2 y 4 h, en duplicado. Al finalizar los estímulos, los cubreobjetos se lavaron con solución tampón Krebs (NaCl 140 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 3,5 mM; MgCl₂ 2 mM; Hepes 10 mM; Glucosa 5,6 mM, pH 7,2-7,4) y se ubicaron en adaptadores para microscopía confocal con 500 μL de la misma solución. Las células se observaron en un microscopio confocal modelo LSM 700 (Carl Zeiss), registrando la fluorescencia obtenida luego de excitar a 488 nm.

5.22. Medición de Ca²⁺ mitocondrial bajo estímulo con histamina

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro en número de 180×10^3 células/pocillo. Al día siguiente del sembrado las células se transfectaron con 1 μg del plásmido Cepia2mt (Suzuki et al., 2014) utilizando como vector Lipofectamina 3000 en medio Opti-MEM según las indicaciones del fabricante. El medio de transfección se mantuvo durante 4 h y luego se cambió al medio de cultivo habitual. Al día siguiente de la transfección se comenzaron los estímulos con doxiciclina de 2 y 4 h, en duplicado. Al finalizar los estímulos, los cubreobjetos se lavaron con solución tampón Krebs (NaCl 140 mM; KCl 5 mM; CaCl₂ 3,5 mM; MgCl₂ 2 mM; Hepes 10 mM; Glucosa 5,6 mM, pH 7,2-7,4) y se ubicaron en adaptadores para microscopía confocal con 300 μL de la misma solución. Las células se observaron en un microscopio confocal modelo LSM 700 (Carl Zeiss), registrando en tiempo real la fluorescencia obtenida luego de excitar a 488 nm. Luego de medir la fluorescencia basal durante 50 segundos, se agregó un estímulo con histamina 100 μM para inducir la liberación de Ca²⁺ desde el RE y se registró a fluorescencia emitida durante otros

100 seg. Finalmente se agregó un estímulo de FCCP 1 μM como control positivo de la técnica, ya que al disipar el potencial mitocondrial se produce la salida de calcio desde la matriz.

5.23. Medición de Ca^{2+} mitocondrial basal

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro en número de 180×10^3 células/pocillo. Al día siguiente del sembrado las células se transfectaron con 1 μg del plásmido mitoGCaMP6m (Hailong et al., 2014) utilizando como vector Lipofectamina 3000 en medio Opti-MEM según las indicaciones del fabricante. El medio de transfección se mantuvo durante 4 h y luego se cambió al medio de cultivo habitual. Al día siguiente de la transfección se comenzaron los estímulos con doxiciclina de 2 y 4 h, en duplicado. Al finalizar los estímulos, los cubreobjetos se lavaron con solución tampón Krebs (NaCl 140 mM; KCl 5 mM; CaCl_2 3,5 mM; MgCl_2 2 mM; Hepes 10 mM; glucosa 5,6 mM, pH 7,2-7,4) y se ubicaron en adaptadores para microscopía confocal con 300 μL de la misma solución. Las células se observaron en un microscopio spinning disk modelo IX81 (Olympus), registrando en tiempo real la fluorescencia obtenida luego de excitar a 490 nm (sensible a Ca^{2+}) y a 420 nm (insensible a Ca^{2+}). Luego de medir la fluorescencia basal durante 50 seg, se agregó un estímulo con histamina 100 μM para inducir la liberación de Ca^{2+} desde el RE y se registró a fluorescencia emitida durante otros 100 seg. Finalmente se agregó un estímulo de FCCP 1 μM como control positivo de la técnica, ya que al disipar el potencial mitocondrial se produce la salida de Ca^{2+} desde la matriz.

5.24. Análisis digital de imágenes

Una vez obtenidas las distintas imágenes de microscopía confocal, éstas se deconvolucionaron, mediante el software Image J, para eliminar la fluorescencia fuera de foco, usando el modelo teórico de algoritmo de deconvolución Landweber y la PSF (*Point Spread Function*) correspondiente a las condiciones experimentales. Al finalizar la deconvolución, se realizaron máscaras o regiones de interés, según el experimento, para analizar cada célula o región por separado. Para el experimento de mitoKeima se analizó

la relación de la fluorescencia emitida luego de excitar a 488 y 555 nm. En el caso de la inmunofluorescencia indirecta y el experimento de Split-GFP, se fijaron umbrales para cada canal de detección y, según el caso, se cuantificó el número de objetos, utilizando el programa accesorio 3D Object Counter para Image J, el área de fluorescencia, o la colocalización mediante los coeficientes de Manders, para lo cual se utilizó el programa accesorio Colocalization Finder para Image J. Para los experimentos de captación de Ca^{2+} mitocondrial, se determinaron los niveles de fluorescencia en distintas regiones de interés de células individuales. Los valores se expresaron como $\Delta F/F_0$, donde ΔF corresponde a $F - F_0$, y F_0 a la fluorescencia basal, respectivamente.

5.25. Análisis estadístico

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA de una o dos vías, según el experimento, considerando los datos como pareados (a menos que el análisis indique lo contrario) y asumiendo la esfericidad de los datos. Para el análisis de comparaciones múltiples se utilizó el post test de Holm-Sidak. Se consideró como significativo un $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Para dar respuesta al primer objetivo específico, es decir, el curso temporal de la activación de la UPR^{mt} frente a un estrés de origen mitocondrial, se procedió a evaluar el efecto del tratamiento con doxiciclina sobre la expresión de proteínas mitocondriales y la expresión de genes relacionados con UPR^{mt} en células HeLa.

6.1. Efecto de la doxiciclina sobre el balance de expresión de proteínas mitocondriales

Los complejos respiratorios mitocondriales están compuestos por decenas de subunidades proteicas, las cuales deben plegarse y ensamblarse correctamente para su funcionamiento óptimo (Mick et al., 2011). Excepto el complejo II, los otros 4 complejos (incluyendo la ATP sintasa o complejo IV) presentan subunidades con origen dual: algunas subunidades se encuentran codificadas en el DNA nuclear, mientras que otras se encuentran codificadas en el DNA mitocondrial (Couvillion et al., 2016; Harbauer et al., 2014; Richter-Dennerlein et al., 2016). Este hecho implica una dificultad adicional para lograr el correcto plegamiento y ensamblaje de los complejos respiratorios, ya que se debe contar con cantidades estequiométricas de todas las subunidades, requiriendo una coordinación fina entre la expresión de proteínas de origen nuclear y mitocondrial (Couvillion et al., 2016; Richter-Dennerlein et al., 2016). Se ha descrito en la literatura que alteraciones en este balance gatillan estrés mitocondrial por acumulación de subunidades no ensambladas la IMM (Houtkooper et al., 2013).

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro que actúan a través de la inhibición de la traducción bacteriana por su unión a la subunidad 30S del ribosoma microbiano. Debido a su origen endosimbionte, las mitocondrias también son susceptibles a la inhibición de la traducción por tetraciclinas (Chatzisprou et al., 2015; Moullan et al., 2015). Se ha mostrado que las tetraciclinas son desencadenantes de estrés mitocondrial al producir el llamado “desbalance mitonuclear”, debido a la descoordinación en la expresión de las subunidades de los complejos respiratorios (Chatzisprou et al., 2015; Houtkooper et al., 2013; Moullan et al., 2015).

En este objetivo, como primera aproximación se evaluaron los efectos de la doxiciclina sobre los niveles, analizados por Western blot, de proteínas que conforman subunidades

de los complejos respiratorios: MTCO1, perteneciente al complejo citocromo C oxidasa o complejo IV, codificada en el DNA mitocondrial; y SDHA, que forma parte del complejo succinato deshidrogenasa o complejo II, y que está codificada en el DNA nuclear (Houtkooper et al., 2013; Moullan et al., 2015).

A partir de datos de la literatura, se eligieron dos concentraciones de doxiciclina para comenzar los ensayos: 15 y 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Houtkooper et al., 2013). El tratamiento con doxiciclina se realizó a distintos tiempos de exposición, considerando que, en la literatura del área, el tiempo de exposición utilizado es el de 48 h (Houtkooper et al., 2013). Como se observa en la **Figura 5**, el tratamiento con doxiciclina 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produjo una disminución de un 30% de los niveles de MTCO1 con respecto a SDHA, lo cual se mantiene de forma consistente entre las 24 y 72 h de tratamiento, a pesar de que la diferencia estadísticamente significativa sólo se obtiene a las 24 h.

De forma similar, el tratamiento con doxiciclina 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuyó los niveles de MTCO1 con respecto a SDHA (**Figura 6**), pero observándose un efecto tiempo-dependiente más marcado, siendo la disminución estadísticamente significativa a las 48 y 72 h de estímulo.

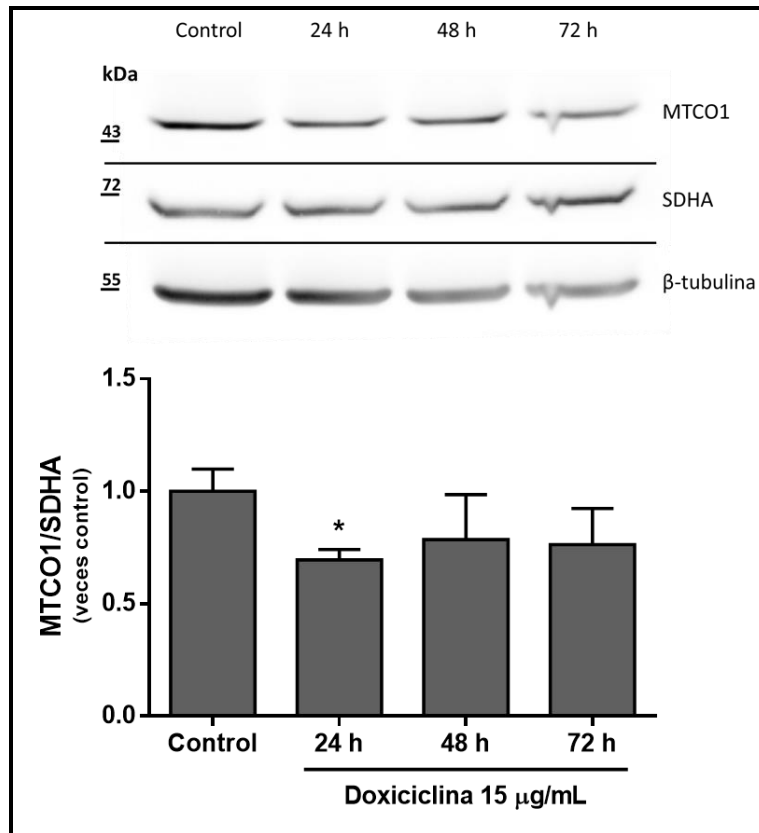


Figura 5. Efecto del tratamiento con doxiciclina 15 μ g/mL sobre la expresión de proteínas mitocondriales codificadas en DNA nuclear y mitocondrial en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina 15 μ g/mL durante el tiempo indicado. Análisis mediante Western blot de los niveles de MTCO1 (codificado en DNA mitocondrial) y SDHA (codificado en DNA nuclear) en extractos celulares totales. * $p < 0,05$ versus control ($n=5$). Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

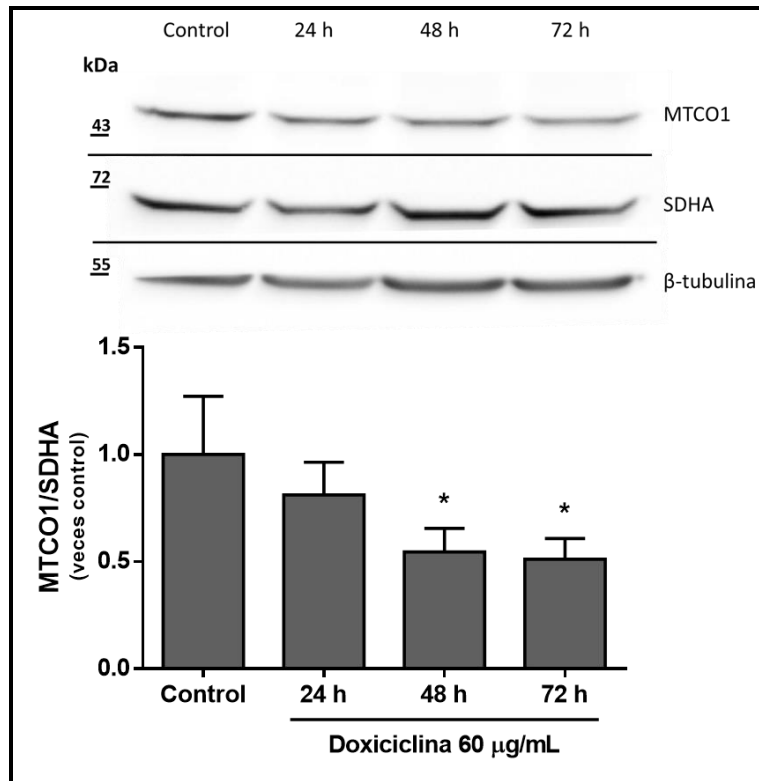


Figura 6. Efecto del tratamiento con doxiciclina 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la expresión de proteínas mitocondriales codificadas en DNA nuclear y mitocondrial en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante el tiempo indicado. Análisis mediante Western blot de los niveles de MTCO1 (codificado en DNA mitocondrial) y SDHA (codificado en DNA nuclear) en extractos celulares totales. * $p < 0,05$ versus control ($n=5$). Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

6.2. Efecto de la doxiciclina sobre la expresión de genes blanco de la UPR^{mt}

Una vez verificada la acción de la doxiciclina sobre la expresión de proteínas mitocondriales, se evaluaron los niveles de mRNA de distintos marcadores de la UPR^{mt} mediante RT-qPCR en las mismas condiciones experimentales anteriores, para conocer la respuesta celular frente a esta alteración. Los marcadores utilizados fueron CHOP y C/EBP β (Horibe & Hoogenraad, 2007; Zhao et al., 2002), que participan en la expresión de los genes blancos de la UPR^{mt}, y mtHsp60 y ClpP (Aldridge et al., 2007; Zhao et al., 2002), que son genes blancos de esta respuesta y ejercen funciones de chaperona molecular y proteasa de matriz mitocondrial, respectivamente.

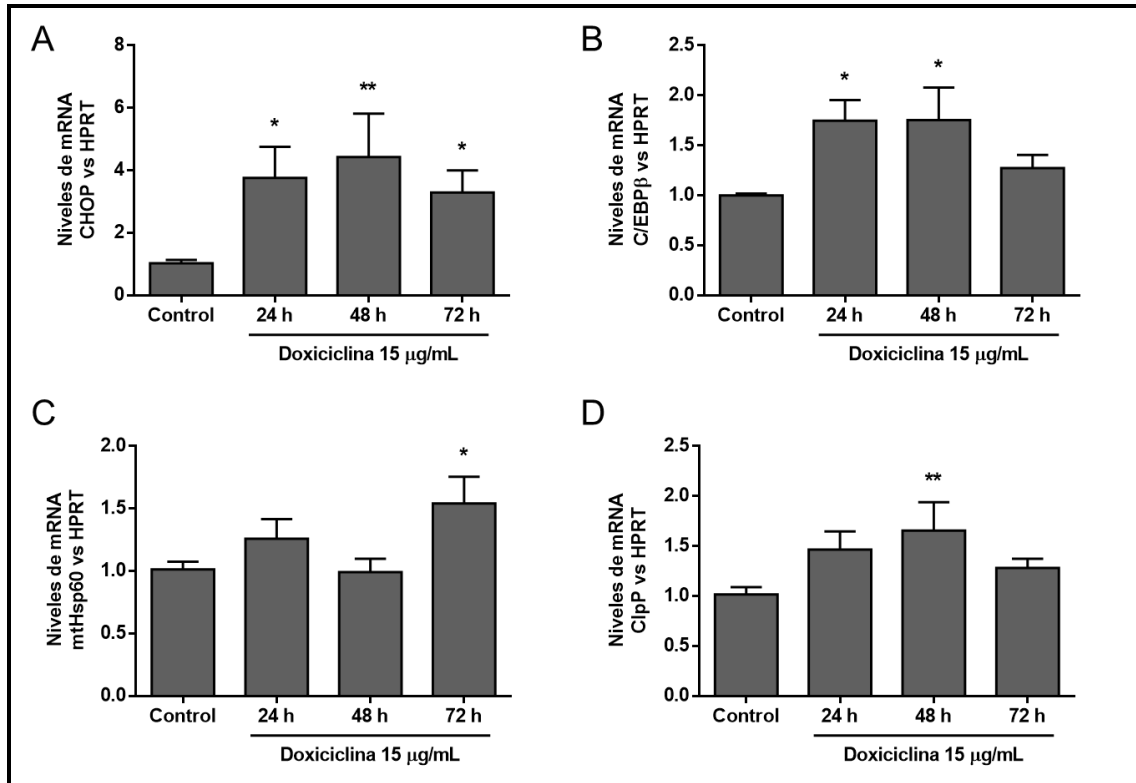


Figura 7. Efecto del tratamiento con doxiciclina 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la expresión de genes marcadores de UPR^{mt} en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante el tiempo indicado. Análisis comparativo de los niveles de mRNA de distintos marcadores de UPR^{mt} versus el gen constitutivo HPRT, normalizando en cada caso contra el control. (A) CHOP, (B) C/EBP β , (C) mtHsp60, (D) ClpP. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ versus control ($n=5-8$). Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

De acuerdo a lo observado en la **Figura 7**, doxiciclina a una concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentó la expresión de todos los marcadores analizados, con distintos niveles de aumento y temporalidades, siendo el tiempo de 48 h el que generó resultados más claros. Con la concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxiciclina (**Figura 8**) se obtuvieron resultados similares, aunque los cambios parecen ser más consistentes y sostenidos en el tiempo, excepto en el caso de CHOP, donde se observó un aumento mayor a las 48 h de tratamiento.

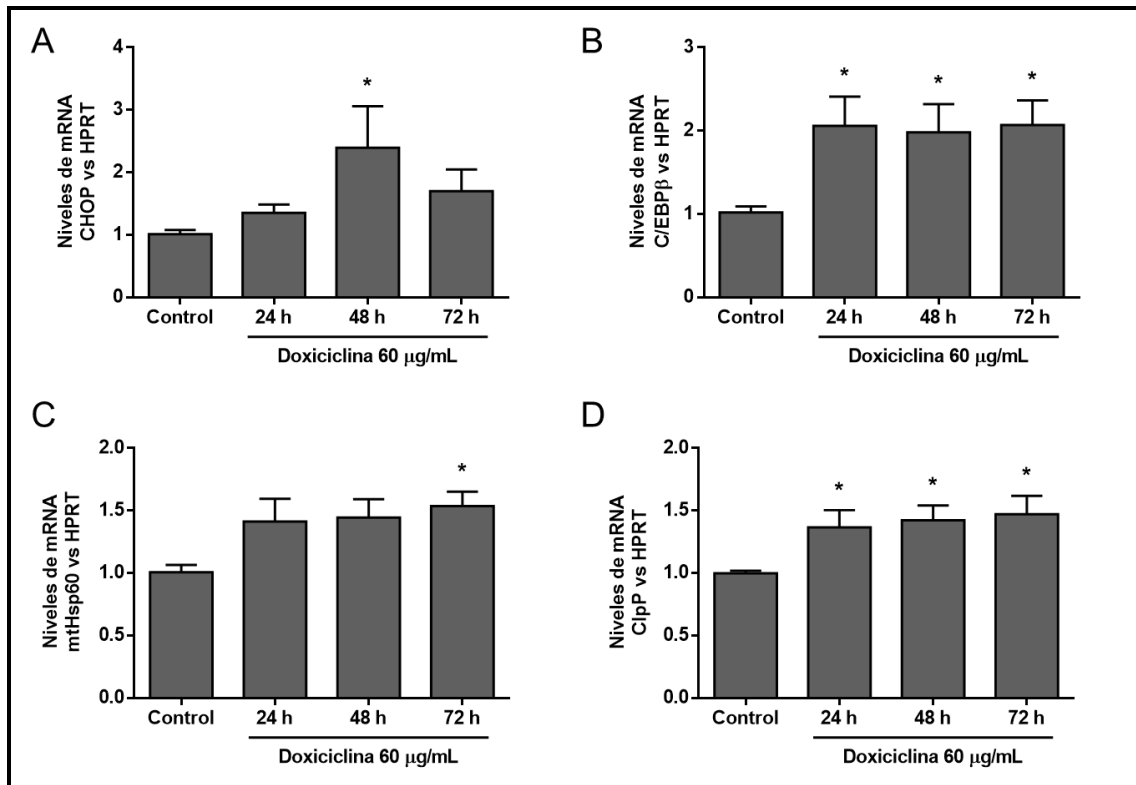


Figura 8. Efecto del tratamiento con doxiciclina 60 μg/mL sobre la expresión de genes marcadores de UPR^{mt} en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina 60 μg/mL durante el tiempo indicado. Análisis comparativo de los niveles de mRNA de distintos marcadores de UPR^{mt} versus el gen constitutivo HPRT, normalizando en cada caso contra el control. (A) CHOP, (B) C/EBPβ, (C) mtHsp60, (D) ClpP. * $p < 0,05$ versus control ($n=5-8$). Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

Además, a modo de control de la especificidad de la respuesta, se analizó la expresión de un marcador de UPR de RE: *Hspa5* (también conocido con Grp78 o Bip) (Bravo et al., 2013). Utilizando como control positivo tunicamicina, un conocido inductor de UPR^{RE} (Bravo et al., 2011), se mostró que doxiciclina no induce el aumento en la expresión de este marcador a ninguna de las dos dosis ensayadas a 48 h de tratamiento, que fue el tiempo con resultados más consistentes en la expresión de marcadores de UPR^{mt} (Figura 9).

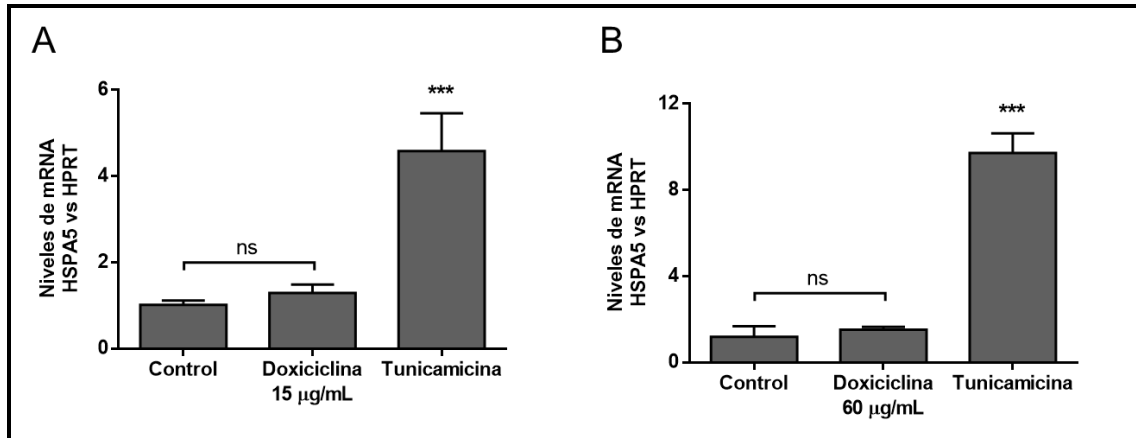


Figura 9. Efecto del tratamiento con doxiciclina sobre la expresión de un gen marcador de UPR^{RE} en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina durante 48 h. Análisis comparativo de los niveles de mRNA de Hspa5, como marcador de UPR^{RE} versus el gen constitutivo HPRT, normalizando en cada caso contra el control. Como control positivo de la activación de UPR^{RE} se utilizó tunicamicina 0,5 µg/mL durante 24 h. (A) Doxiciclina 15 µg/mL, (B) Doxiciclina 60 µg/mL. *** p < 0,001 versus control (n=3-5). Promedio ± SEM; ns: no significativo. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

6.3. Efecto de la doxiciclina sobre la viabilidad celular

Una vez establecidos los efectos del tratamiento con doxiciclina a nivel de expresión de proteínas mitocondriales y de genes marcadores de estrés mitocondrial, se estudió si el estrés producido por este fármaco lleva a la pérdida de la viabilidad celular. Como primera aproximación, se estudió la pérdida de la integridad de la membrana plasmática mediante la incorporación del agente intercalante fluorescente yoduro de propidio (PI) en células no permeabilizadas. De acuerdo a la **Figura 10**, el tratamiento con doxiciclina 15 µg/mL no indujo de forma significativa la pérdida de integridad de la membrana plasmática en ninguno de los tiempos ensayados. Sin embargo, al ensayar la concentración de 60 µg/mL se observó un aumento en el porcentaje de células PI positivas a todos los tiempos ensayados (**Figura 11**), aunque en ningún caso supera el 8% de la población, por lo que no se considera un efecto biológicamente muy significativo.

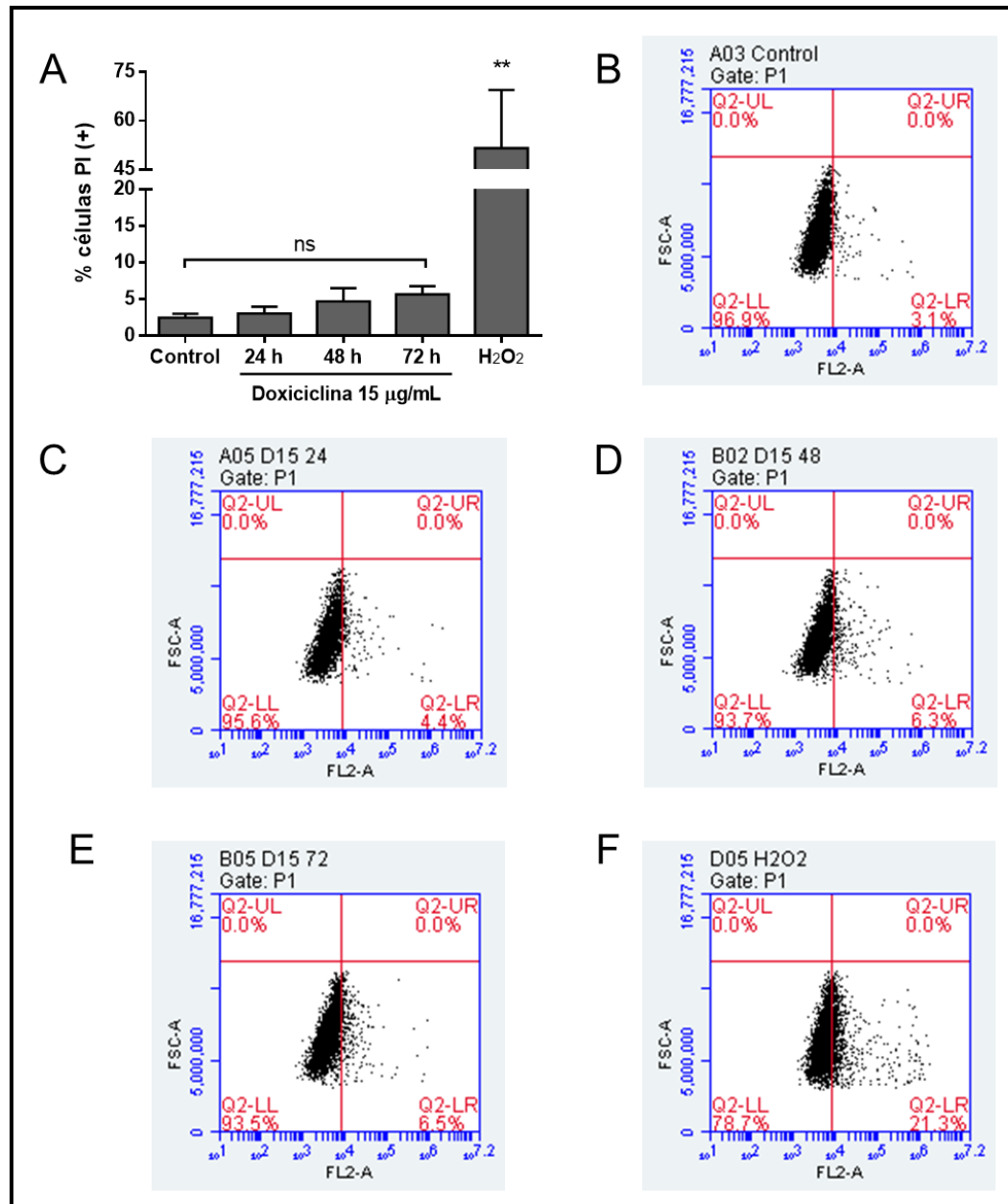


Figura 10. Efecto del tratamiento con doxiciclina 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la incorporación de yoduro de propidio (PI) en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina durante el tiempo indicado. Estudio de la incorporación de PI en células no permeabilizadas mediante citometría de flujo. Como control positivo de necrosis se utilizó H₂O₂ 5 mM durante 1 h. (A) Cuantificación del porcentaje de células PI positivas. (B-F) Plots representativos de tamaño celular relativo (FSC) versus emisión de fluorescencia. El umbral se fijó de acuerdo a la fluorescencia emitida por una muestra sin PI. (B) Control, (C) 24 h, (D) 48 h, (E) 72 h, (F) H₂O₂. ** $p < 0,01$ versus control ($n=3$). Promedio \pm SEM; ns: no significativo. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

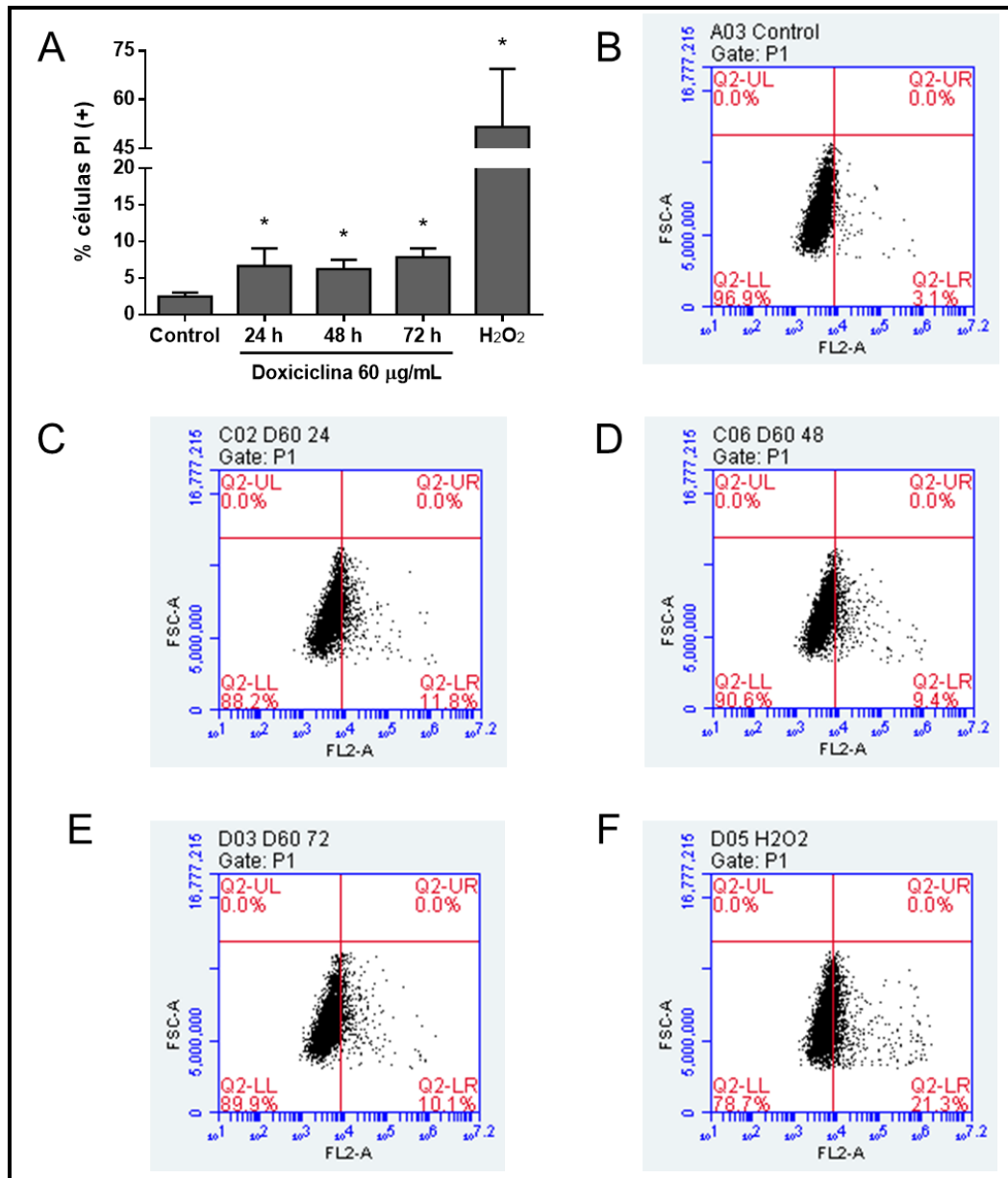


Figura 11. Efecto del tratamiento con doxiciclina 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la incorporación de yoduro de propidio (PI) en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina durante el tiempo indicado. Estudio de la incorporación de PI en células no permeabilizadas mediante citometría de flujo. Como control positivo de necrosis se utilizó H₂O₂ 5 mM durante 1 h. (A) Cuantificación del porcentaje de células PI positivas. (B-F) Plots representativos de tamaño celular relativo (FSC) versus emisión de fluorescencia. El umbral se fijó de acuerdo a la fluorescencia emitida por una muestra sin PI. (B) Control, (C) 24 h, (D) 48 h, (E) 72 h, (F) H₂O₂. * $p < 0,05$ versus control ($n=3$). Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

Como segunda aproximación, para estudiar de forma más específica el proceso de muerte celular por apoptosis, se analizó el porcentaje de la población celular que presenta una cantidad total de DNA menor a la esperada para células diploides en etapa G1, conocida como población subG1. Esto ocurre debido a la acción de endonucleasas durante etapas tardías de la apoptosis. Para realizar este ensayo, las células en suspensión se fijaron y permeabilizaron con metanol y luego se tiñeron con PI para visualizar el contenido total de DNA. De acuerdo a lo observado en la **Figura 12**, el estímulo con doxiciclina 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no produce un aumento significativo de la población de células en subG1, así como tampoco se observan cambios con la dosis de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 13**). Tomando todos estos datos en consideración, podríamos concluir que la concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no produce pérdida de viabilidad celular significativa, mientras que la concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ podría producir un bajo índice de muerte celular total (pérdida de permeabilidad de la membrana), sin indicios de muerte celular programada.

En los primeros ensayos realizados, la concentración de doxiciclina de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue la que presenta resultados más claros, por lo que se utilizó sólo esta concentración en algunos de los siguientes experimentos.

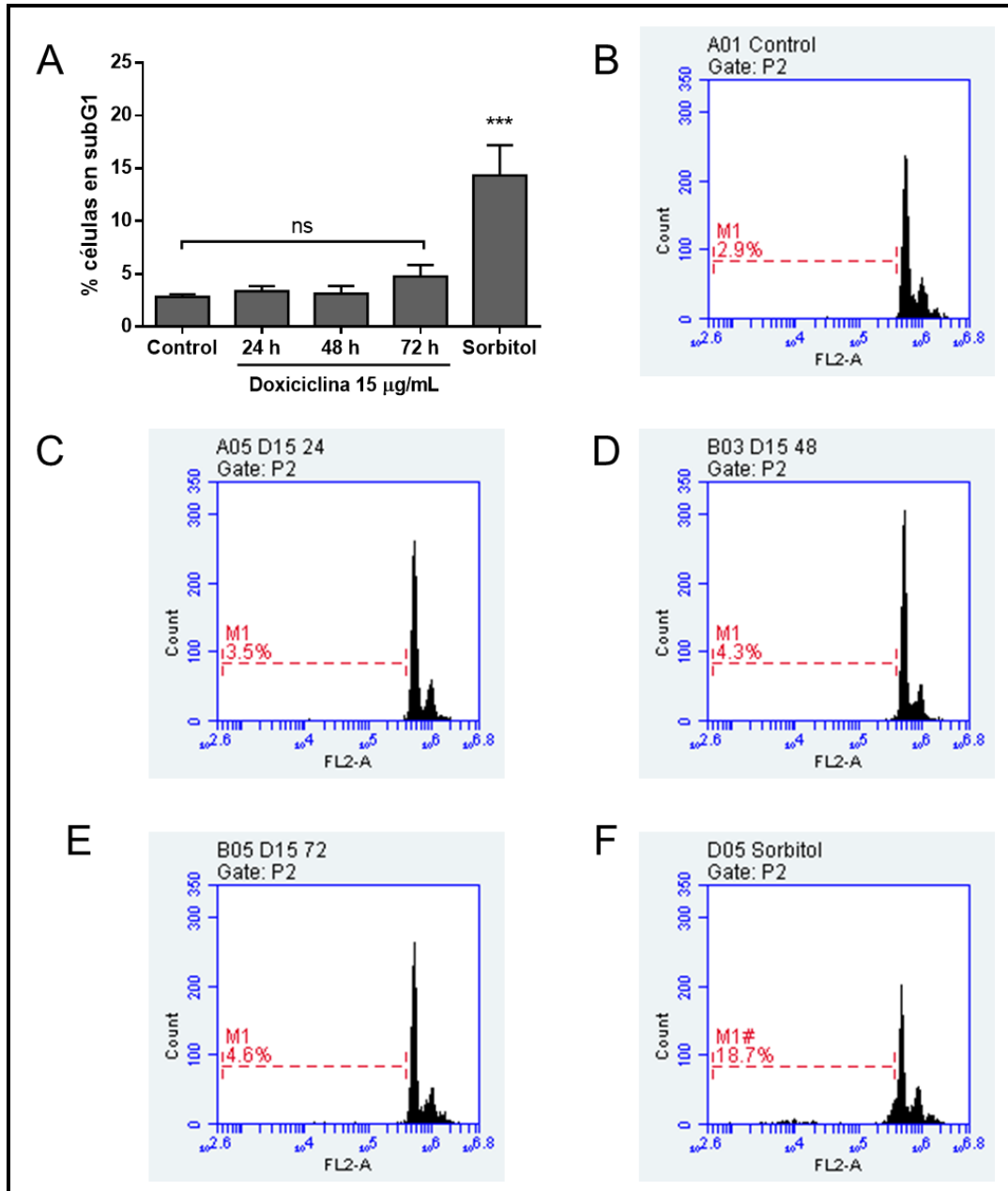


Figura 12. Efecto del tratamiento con doxiciclina 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la población subG1 en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina durante el tiempo indicado. Análisis del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio en células fijadas y permeabilizadas. Como control positivo de apoptosis se utilizó sorbitol 300 mM durante 6 h. (A) Cuantificación del porcentaje de células en subG1. (B-F) Histogramas representativos de emisión de fluorescencia versus número de partículas. (B) Control, (C) 24 h, (D) 48 h, (E) 72 h, (F) Sorbitol. *** $p < 0,001$ versus control ($n=3$). Promedio \pm SEM; ns: no significativo. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

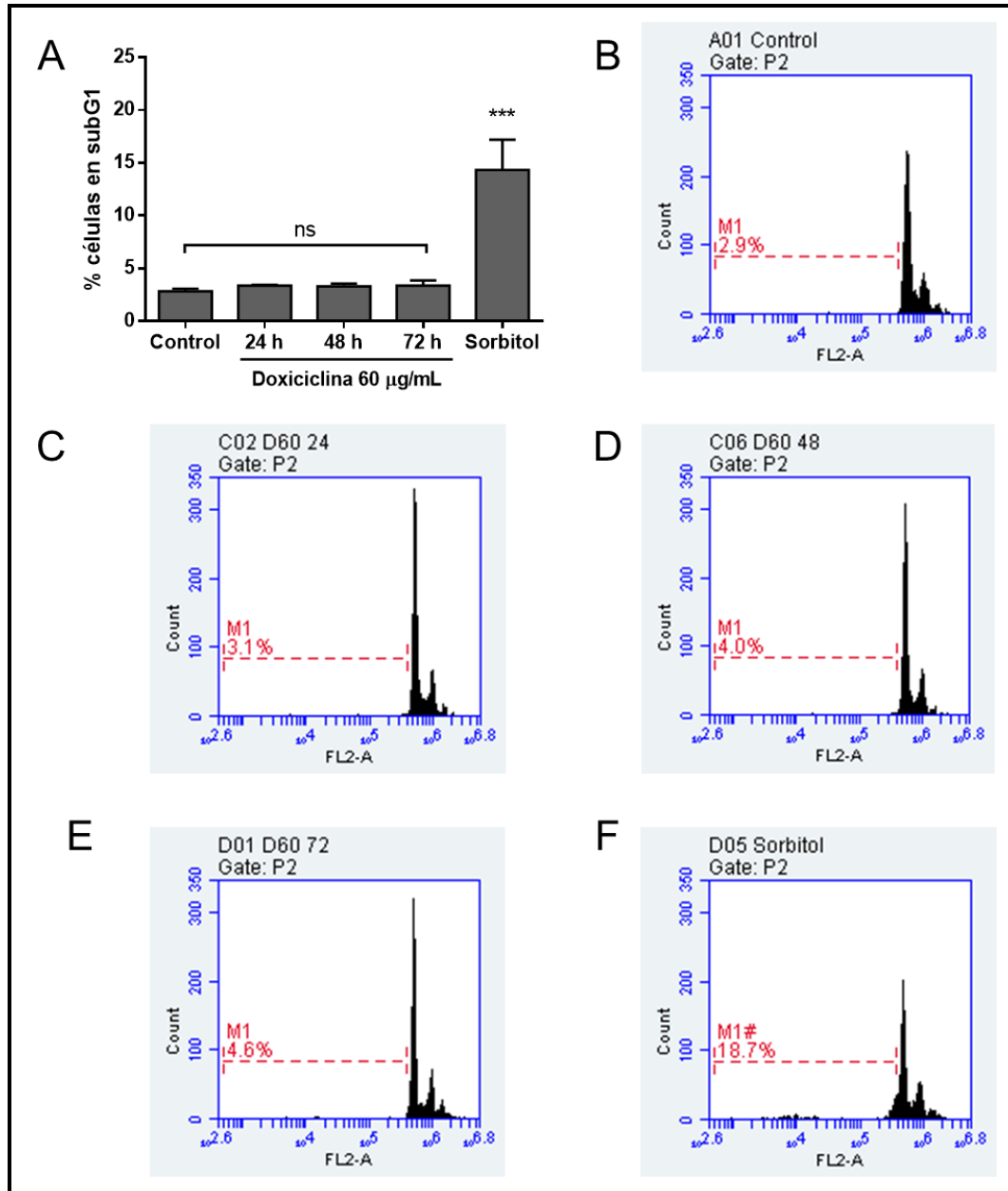


Figura 13. Efecto del tratamiento con doxiciclina 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la población subG1 en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina durante el tiempo indicado. Análisis del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio en células fijadas y permeabilizadas. Como control positivo de apoptosis se utilizó sorbitol 300 mM durante 6 h. (A) Cuantificación del porcentaje de células en subG1. (B-F) Histogramas representativos de emisión de fluorescencia versus número de partículas. (B) Control, (C) 24 h, (D) 48 h, (E) 72 h, (F) Sorbitol. *** $p < 0,001$ versus control ($n=3$). Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

6.4. Efecto de la doxyciclina sobre el proceso de mitofagia

Una vez establecido que la doxyciclina no causa una muerte celular significativa, se evaluó sus efectos sobre la mitofagia. La mitofagia, o autofagia selectiva de mitocondrias, es un proceso de degradación vía lisosomal de mitocondrias dañadas o despolarizadas (Youle & Narendra, 2011). Para evaluar la mitofagia, se utilizó una proteína sensora fluorescente, llamada Keima, con destinación a la matriz mitocondrial (mitoKeima) (Ikeda et al., 2015; Shirakabe et al., 2016; Sun et al., 2015). mitoKeima presenta distintos espectros de absorción y emisión de fluorescencia dependiendo del pH del medio circundante. A pH neutro, como ocurre en una mitocondria intacta, mitoKeima emite fluorescencia luego de ser excitada a 488 nm. Sin embargo, durante el proceso de mitofagia, luego de producirse la fusión del autofagosoma con el lisosoma, se promueve la acidificación del ambiente y mitoKeima se excita a 555 nm (Sun et al., 2015). Además, mitoKeima es resistente a las proteasas lisosomales, por lo tanto, la fluorescencia no decae con el tiempo (Sun et al., 2015). Por lo tanto, mientras mayor sea la emisión de color rojo, mayor será el nivel de mitofagia en la célula.

A modo de estandarización, y en busca de un control positivo apropiado para gatillar mitofagia en células HeLa, se realizó un primer ensayo utilizando distintos gatillantes de mitofagia: disipación del potencial mitocondrial mediante el uso del desacoplante CCCP, inhibición de la cadena transportadora de electrones mediante una mezcla de antimicina A y rotenona, y la privación de nutrientes mediante el uso de medio de cultivo deficiente en glucosa (RPMI) o aminoácidos (EBSS). La **Figura 14** muestra las imágenes representativas obtenidas para cada condición de la estandarización del sensor mitoKeima. De acuerdo a lo observado en las imágenes y en la cuantificación, la privación de nutrientes, ya sea glucosa o aminoácidos, es el tratamiento que tiene mayor afecto en la inducción de mitofagia en células HeLa y serán utilizados a modo de control positivo de mitofagia en el siguiente ensayo.

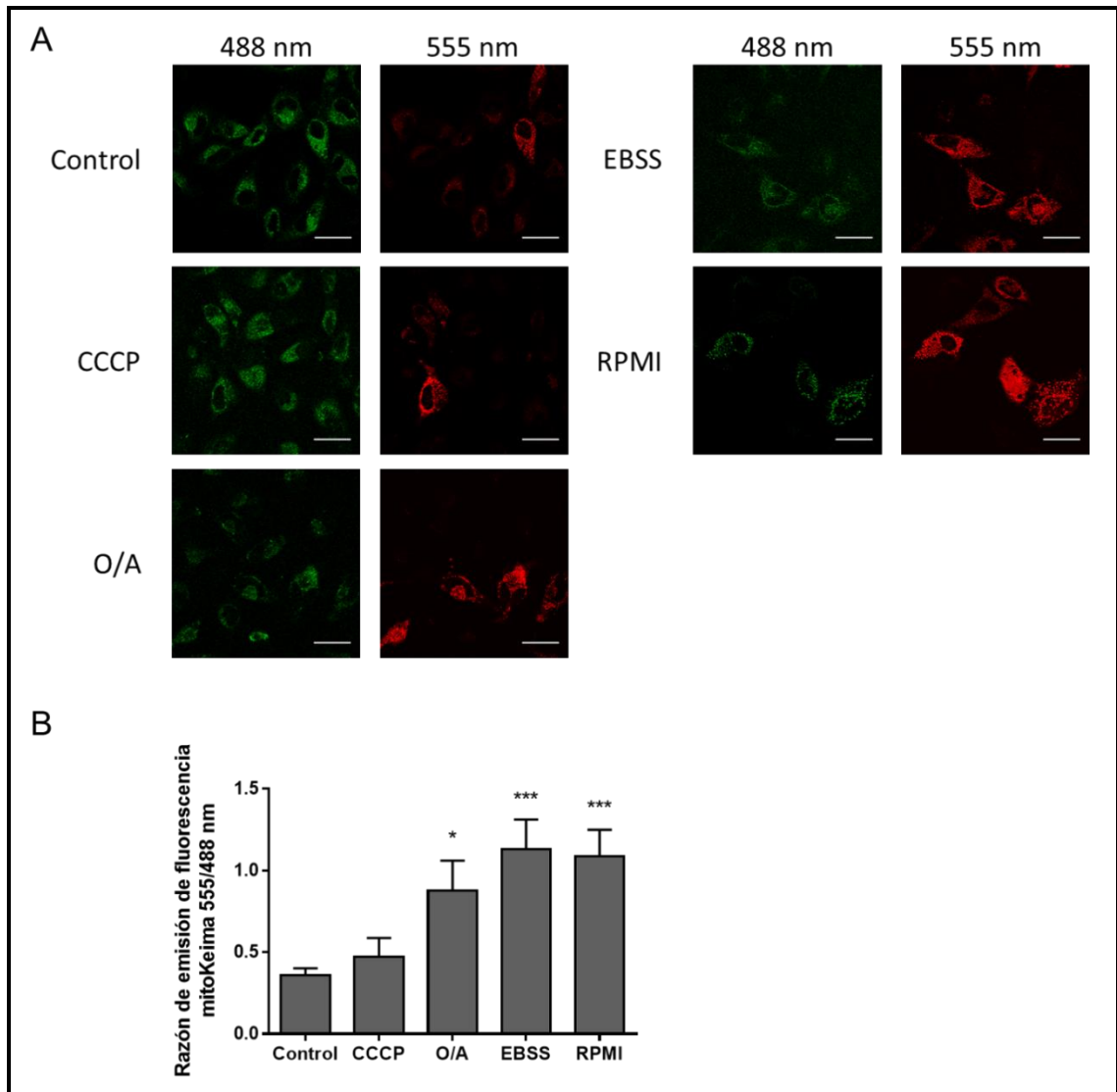


Figura 14. Estandarización del sensor de mitofagia mitoKeima en células HeLa. Las células se transfirieron con el plásmido mitoKeima, y luego de 24 h se estimularon con CCCP 20 μ M, Oligomicina 12 μ M/Antimicina 90 nM (O/A), medio EBSS o medio RPMI durante 24 h. Análisis del proceso de mitofagia mediante microscopía confocal, evaluando la emisión luego de excitar a 488 y 555 nm. (A) Imágenes representativas obtenidas para cada condición. Escala: 40 μ m. (B) Cuantificación de la relación de emisión luego de excitar a 488 y 555 nm. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ versus control. Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak

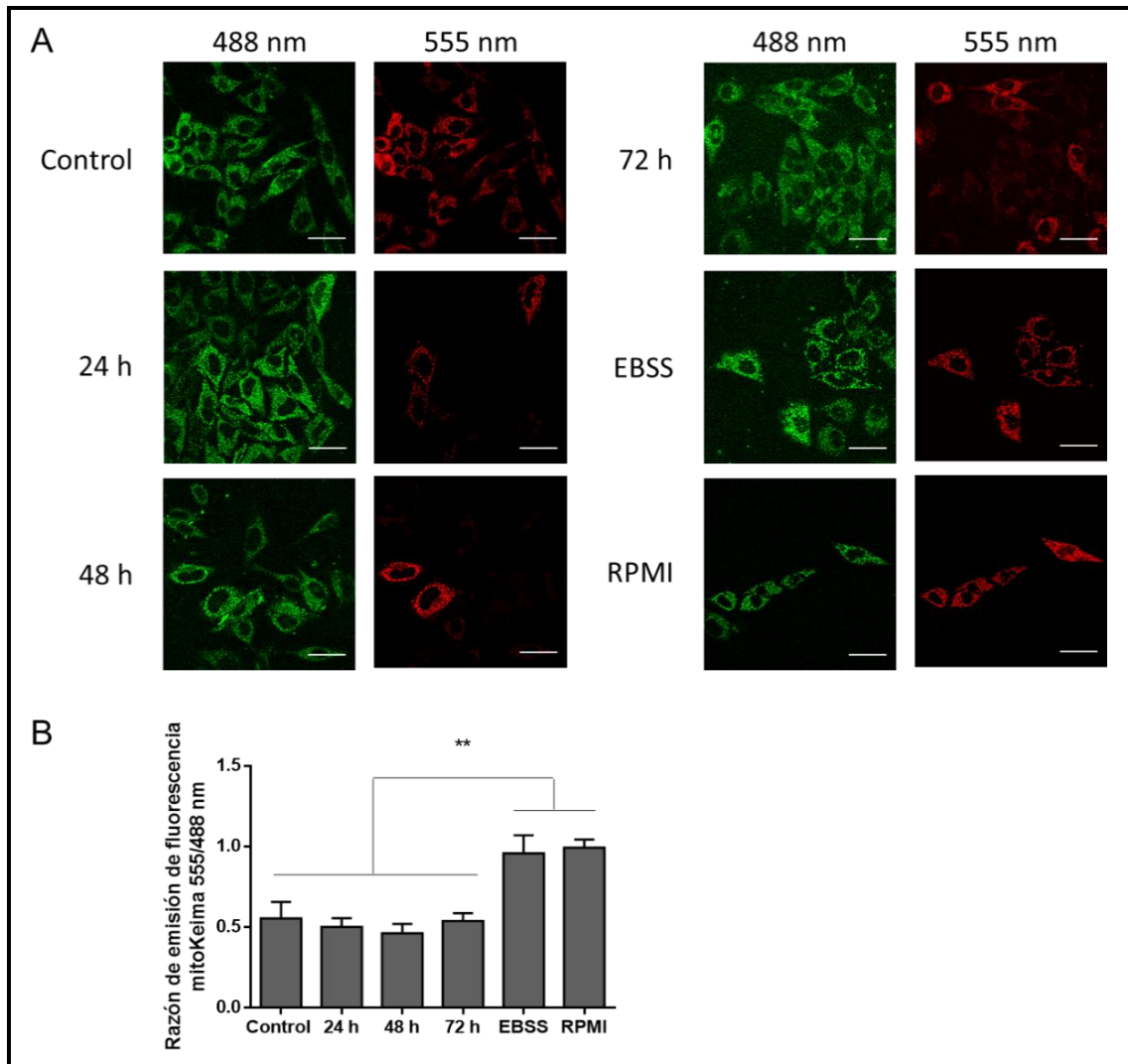


Figura 15. Efecto de doxiciclina sobre la mitofagia en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante el tiempo indicado. 48 h antes del término de los estímulos las células se transfectaron con el plásmido mitoKeima. Análisis del proceso de mitofagia mediante microscopía confocal, evaluando la emisión luego de excitar a 488 y 555 nm. (A) Imágenes representativas obtenidas para cada condición. Escala: 40 μm . (B) Cuantificación de la relación de emisión luego de excitar a 488 y 555 nm. ** $p < 0,01$ versus control ($n=4$). Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

Una vez estandarizadas las condiciones para la evaluación de la mitofagia, se procedió a realizar el ensayo de mitoKeima en las condiciones experimentales anteriores, utilizando la dosis de doxiciclina de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El estímulo con doxiciclina no

indujo cambios significativos en los niveles de mitofagia en ninguno de los tiempos estudiados (**Figura 15**).

Considerando todos los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, podemos concluir que el tratamiento con doxiciclina, a pesar de producir alteraciones en la expresión de proteínas mitocondriales y gatillar la inducción de genes de respuesta a UPR^{mt}, puede ser considerado como un estrés leve ya que no conlleva una muerte celular significativa ni la degradación selectiva de las mitocondrias.

6.5. Efecto de la exposición temprana a doxiciclina en los niveles intracelulares de ATP

De acuerdo a los resultados obtenidos en el objetivo específico 1, se logró establecer un modelo de estrés mitocondrial leve, que conlleva alteraciones en la expresión de genes relacionados con la UPR^{mt}, pero sin inducir muerte celular o degradación selectiva de mitocondrias. Resultados previos obtenidos en nuestro Laboratorio muestran que el estrés de RE leve, es decir, con concentraciones bajas y tiempos tempranos de tratamiento con un estresor, incluso antes de que se manifiesten cambios a nivel transcripcional, induce cambios en el metabolismo celular (Bravo et al., 2011). Estos cambios implican una mayor actividad metabólica, con mayor producción de ATP, con el fin de sustentar las respuestas adaptativas frente al estresor (Bravo et al., 2012).

Por este motivo, para los ensayos de metabolismo celular se eligió trabajar a tiempos cortos de estimulación, antes de que se manifiesten los cambios a nivel genético. De acuerdo a los trabajos previos de nuestro laboratorio, se eligieron tiempos entre 1 y 4 h de estimulación (Bravo et al., 2011).

Para evaluar si el estrés producido por doxiciclina promueve algún cambio en el metabolismo celular, se midieron los niveles intracelulares de ATP. Como se aprecia en la **Figura 16**, los niveles de ATP aumentan levemente a las 2 h de tratamiento con doxiciclina a 15 y 60 µg/mL. Este resultado sugiere que sí existen cambios metabólicos tempranos asociados al estrés mitocondrial. Sin embargo, no se puede establecer si estos cambios se deben a un incremento en el metabolismo mitocondrial dado que se analizaron los niveles intracelulares de ATP totales sin discernir si este ATP se generó o no en las mitocondrias.

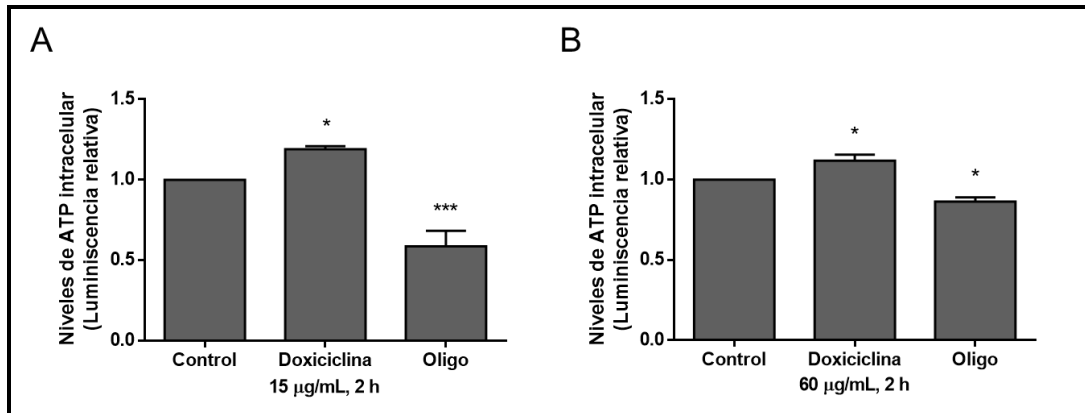


Figura 16. Efecto de doxiciclina en los niveles intracelulares de ATP en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina 15 ó 60 µg/mL durante 2 h. Análisis de los niveles relativos de ATP intracelular medidos mediante un kit comercial basado en luminiscencia. Oligomicina 2 µM durante 1 h, un inhibidor de la ATP sintasa, se utilizó como control de la técnica. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ versus control (n=4-9. Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

6.6. Efecto de la exposición temprana a doxiciclina en la tasa de respiración celular

Un indicador más directo de la función mitocondrial es la medición de la velocidad de consumo de oxígeno. Mediante oxigrafía en electrodo de Clark, se analizó la velocidad de consumo de oxígeno basal y luego se agregó el desacoplante CCCP para medir la respiración máxima. Los resultados con la concentración de 15 µg/mL de doxiciclina permiten observar una tendencia al aumento de la respiración, tanto basal como máxima, a todos los tiempos ensayados (**Figura 17A**), sin embargo, la diferencia estadísticamente significativa se obtuvo cuando se analiza solamente a las 4 h de tratamiento (**Figura 17B**). De forma similar, a la concentración de 60 µg/mL también se observó una tendencia al aumento de la respiración basal y máxima, aunque en este caso es bastante más marcada la diferencia a las 4 h de estímulo con respecto a los otros tiempos de estimulación (**Figura 18**). Por otra parte, se analizó el potencial mitocondrial mediante la sonda fluorescente TMRM y microscopía confocal, sin encontrar diferencias significativas al tratar con doxiciclina 60 µg/mL (**Figura 19**).

Con estos resultados, se puede inferir que el aumento en los niveles de ATP intracelular podría ser causa del incremento en el metabolismo oxidativo a nivel mitocondrial, indicado por la mayor tasa de respiración.

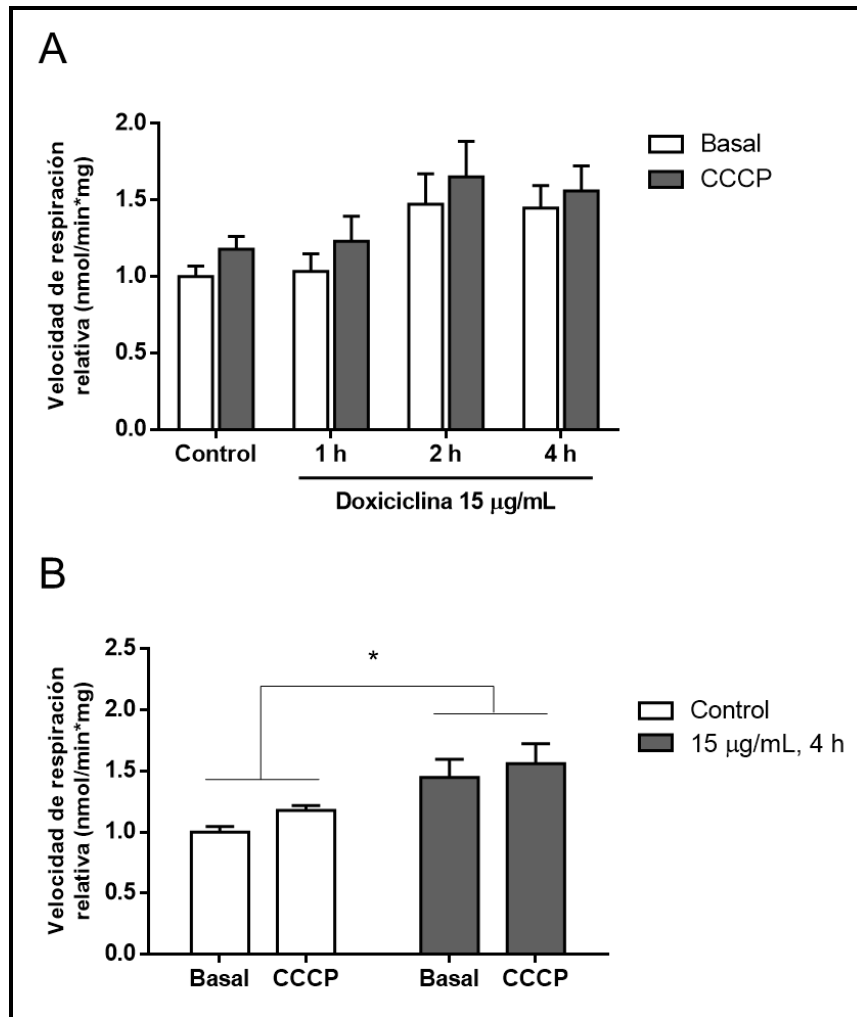


Figura 17. Efecto de doxyciclina 15 µg/mL sobre la tasa de respiración celular en células HeLa. Análisis comparativo de la velocidad de respiración celular, medida en electrodo de Clark. Para la medición de la respiración máxima, se utilizó CCCP 200 nM. (A) Tasa de respiración luego del tratamiento con doxyciclina 15 µg/mL durante 1, 2 y 4 h. (B) Para una mejor visualización se muestra sólo el tiempo de 4 h de estímulo. * p < 0,05 (n=5). Promedio ± SEM; Análisis mediante ANOVA de dos vías seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

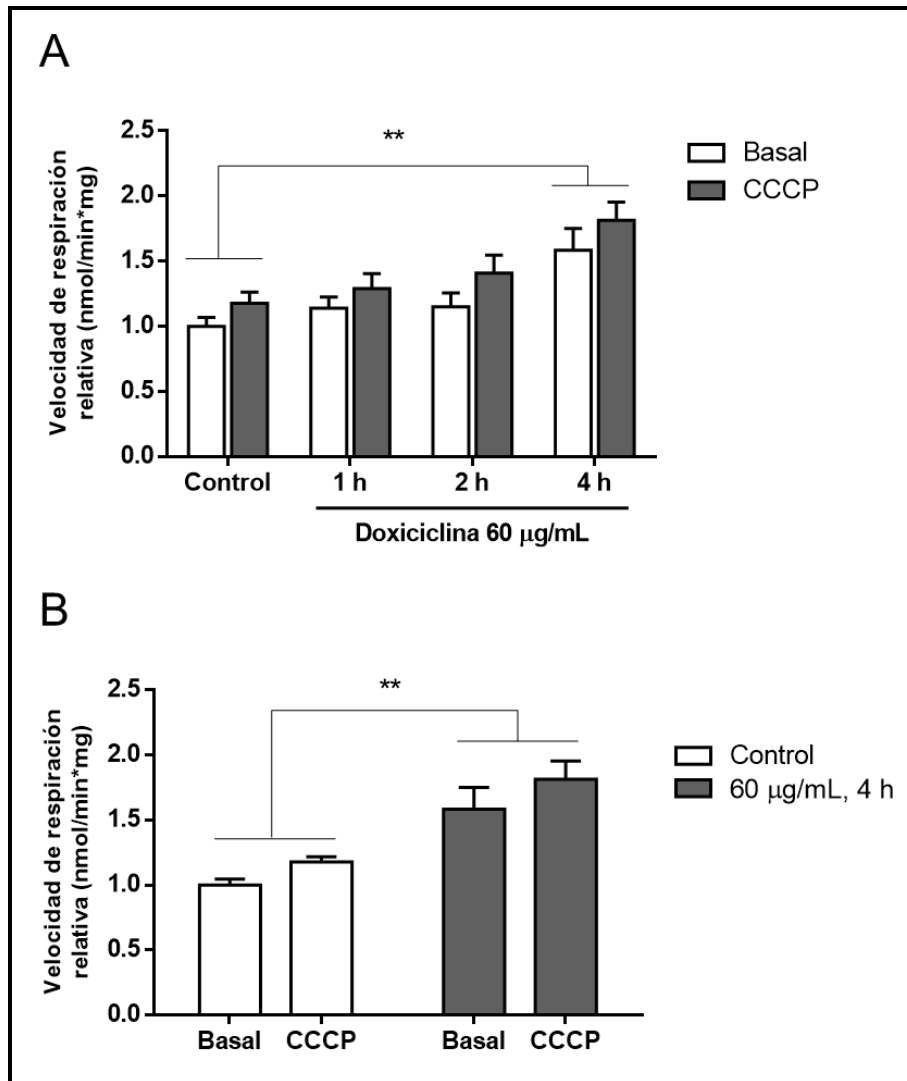


Figura 18. Efecto de doxiciclina 60 µg/mL sobre la tasa de respiración celular en células HeLa. Análisis comparativo de la velocidad de respiración celular, medida en electrodo de Clark. Para la medición de la respiración máxima, se utilizó CCCP 200 nM. (A) Tasa de respiración luego del tratamiento con doxiciclina 15 µg/mL durante 1, 2 y 4 h. (B) Para una mejor visualización se muestra sólo el tiempo de 4 h de estímulo. * $p < 0,05$ ($n=5$). Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de dos vías seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

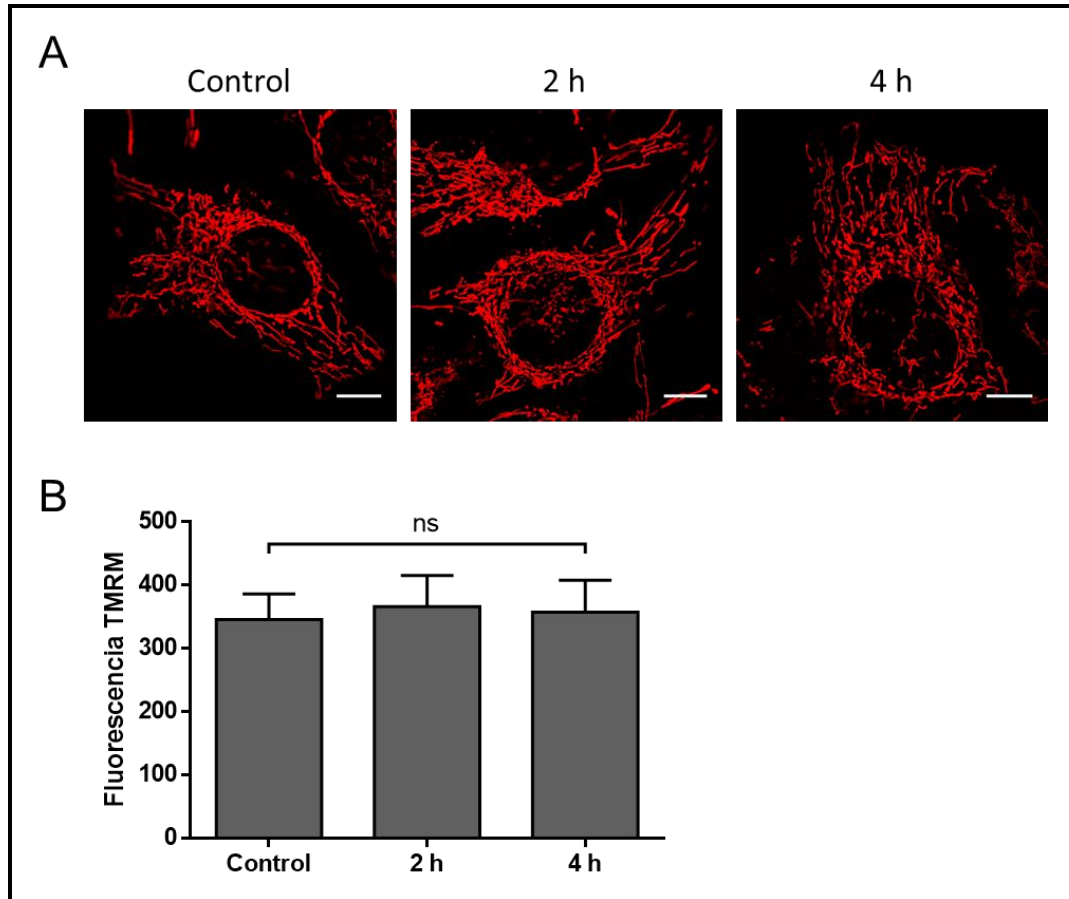


Figura 19. Efecto de doxiciclina 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre el potencial mitocondrial en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante el tiempo indicado. En los últimos 30 min de estímulo se trataron con TMRM 20 nM y se analizó la fluorescencia basal mediante microscopía confocal ($n=5$). (A) Imágenes representativas de la marca de TMRM. Escala: 10 μm . (B) Cuantificación de la fluorescencia promedio de TMRM durante 50 seg de medición. Promedio \pm SEM; ns: no significativo. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

6.7. Efecto de la exposición temprana a doxiciclina en el acoplamiento físico entre RE y mitocondria

Posteriormente, para estudiar si los cambios metabólicos inducidos por doxiciclina son paralelos a cambios en la comunicación entre el RE y las mitocondria, tal como ocurre en el caso del estrés de RE leve (Bravo et al., 2011, 2012), se analizó por un lado los contactos físicos entre ambos organelos y, por otra parte, la comunicación funcional mediante la medición de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial frente a la liberación de este ion por parte del RE. Para analizar los contactos físicos entre RE y mitocondria se comenzó analizando la co-localización entre la proteína Hsp70 mitocondrial y calnexina como marcador de RE mediante inmunofluorescencia indirecta a los mismos tiempos de estimulación utilizados para medir la tasa de respiración celular. De acuerdo a los resultados mostrados en la **Figura 20** se observa que a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con doxiciclina, existe mayor co-localización de las señales correspondientes a RE y mitocondrias. Al cuantificar los coeficientes de Manders se observó una tendencia tiempo-dependiente al aumento de la co-localización de mitocondrias sobre RE, alcanzando significancia estadística a las 4 h de tratamiento con doxiciclina (**Figura 20B**). Sin embargo, al analizar los coeficientes de Manders de RE sobre mitocondrias no se observan diferencias a ninguno de los tiempos analizados. Estos hallazgos sugieren que son las mitocondrias las que se acercan al RE y no viceversa.

Como una aproximación complementaria, se empleó una nueva herramienta que permitió analizar la cercanía entre RE y mitocondria de forma más específica. Dicha herramienta, gentilmente donada por el Dr. Gyorgy Szabadkai (UCL, Londres), consiste en la expresión, por un lado, de una porción de la proteína fluorescente verde GFP (Split GFP) destinada a RE (ER GFP β 11) y, por otra parte, la otra porción de GFP destinada a mitocondria (OMM GFP β 1-10) (Cabantous et al., 2005; Granatiero et al., 2016). De esta forma, cuando ambos organelos se encuentran a la distancia apropiada se produce la complementación bimolecular de GFP (Cabantous et al., 2005) y, por lo tanto, se observa una marca fluorescente en los puntos de contacto. En primer lugar, se realizó una estandarización de la expresión de distintas combinaciones de Split GFP para verificar su correcta expresión y complementación. Se probó transfectando las células

con 1 μg del plásmido OMM GFP β 1-10, que expresa la porción β 1-10 de Split GFP destinado a la membrana mitocondrial externa, más 1 μg de uno de los siguientes plásmidos: 1) Cytosolic GFP β 11 + RFP, que contiene la porción β 11 de Split GFP con destinación citosólica y además expresa RFP como control de transfección; 2) ER GFP β 11 short, que expresa la porción β 11 de Split GFP asociado a la membrana del RE mediante un enlazador corto; y 3) ER GFP β 11 long, que expresa la porción β 11 de Split GFP asociado a la membrana del RE mediante un enlazador más largo.

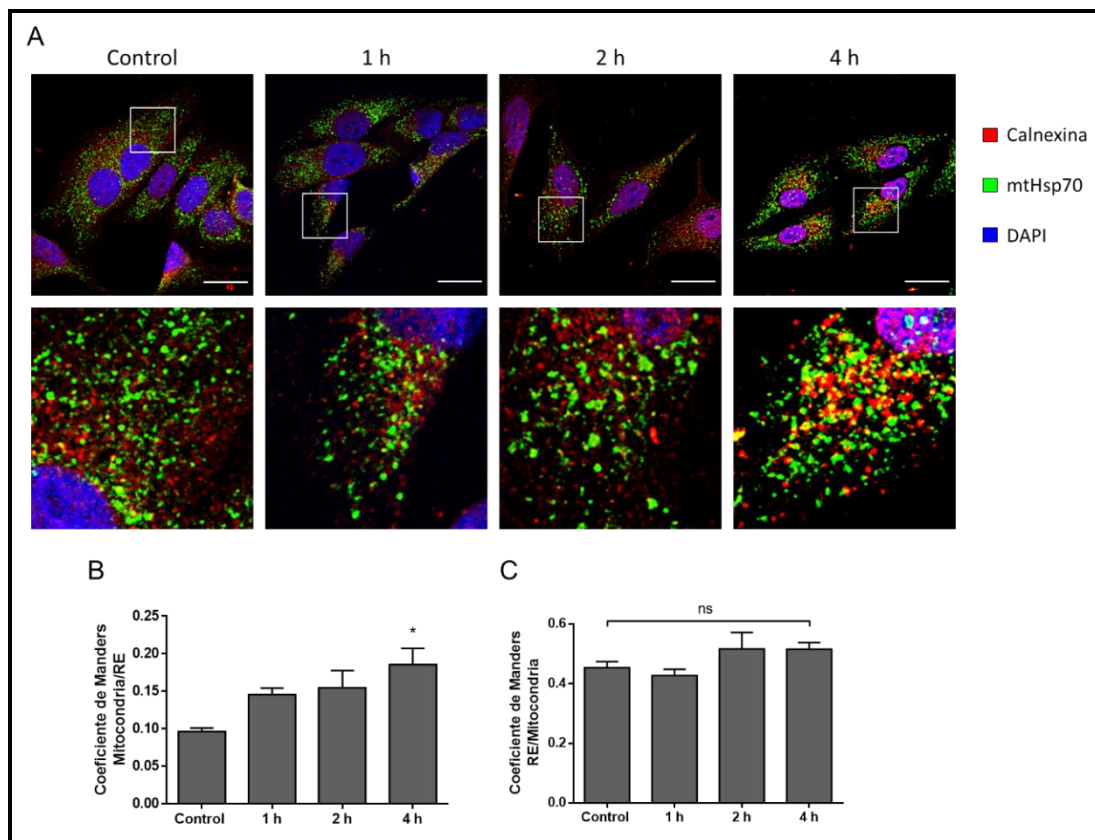


Figura 20. Efecto de doxiciclina sobre los contactos RE-mitocondria evaluados mediante Inmunofluorescencia indirecta en células HeLa. Las células se trataron con doxiciclina 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante los tiempos indicados. Análisis de co-localización mediante inmunofluorescencia indirecta. (A) Imágenes representativas para cada condición. Los colores corresponden a: Rojo, calnexina (RE); verde, mtHsp70 (mitocondria); azul, DAPI (núcleo). Escala: 20 μm . En los paneles inferiores se muestra una magnificación de 5X. (B) Coeficientes de Manders de mitocondrias sobre RE. (C) Coeficientes de Manders de RE sobre mitocondrias. * $p < 0,05$ versus control ($n=3$). Promedio \pm SEM; ns: no significativo. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

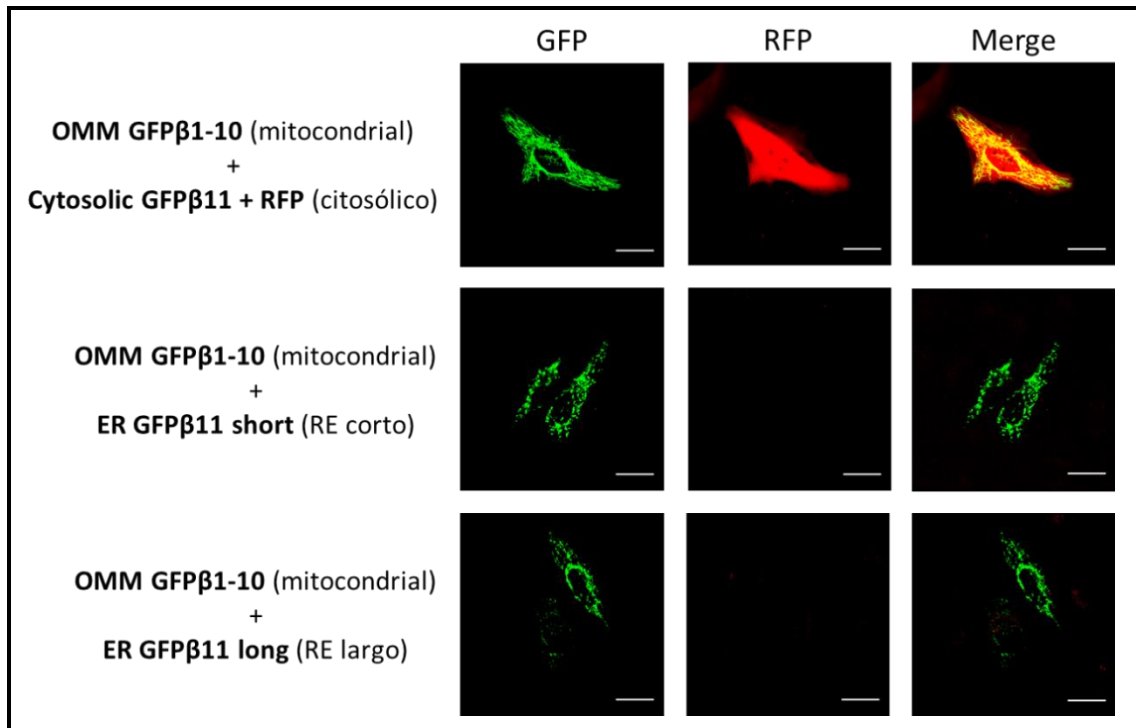


Figura 21. Ensayo de la evaluación de los contactos RE-mitocondria con el sensor Split-GFP en células HeLa. Las células se transfectaron con las tres combinaciones de Split-GFP (OMM GFP β 1-10 + [ER GFP β 11 short, ER GFP β 11 long o Cytosolic GFP β 11 + RFP]) y luego de 24 h se analizaron mediante microscopía confocal, evaluando la emisión luego de excitar a 488 y 555 nm. Escala: 30 μ m.

En la **Figura 21** se muestra el resultado del ensayo de la expresión de las distintas combinaciones de Split GFP. En todos los casos se logró la expresión y la complementación bimolecular, al observarse la fluorescencia correspondiente a GFP. Al utilizar el control de expresión citosólica + RFP se observó claramente la expresión de RFP, lo que permitió verificar que la co-transfección fue efectiva en un gran porcentaje de la población celular. Además, dada la expresión citosólica de la porción GFP β 11, se observa la fluorescencia de GFP a lo largo de toda la red mitocondrial, dando cuenta de la correcta localización del marcador. Por otra parte, al estudiar la co-transfección de OMM GFP β 1-10 con las porciones ER GFP β 11 short y long, se observó un patrón de fluorescencia menos continuo y en algunos casos más punteados, indicando que la fluorescencia sólo se produce en lugares determinados de la red mitocondrial, que corresponderían a los puntos de contacto entre RE y mitocondrias. De acuerdo con estas

observaciones, la **Figura 21** muestra que el patrón de fluorescencia de ER GFP β 11 short es más extenso que el de ER GFP β 11 long, lo cual se explica porque al tener un enlazador de menor longitud, permite una mejor complementación bimolecular en lugares estrechos, como lo es la interfase entre RE y mitocondria. En cambio, la mayor longitud del enlazador de ER GFP β 11 long sólo le permite lograr la complementación bimolecular en lugares donde la distancia entre RE y mitocondria es mayor.

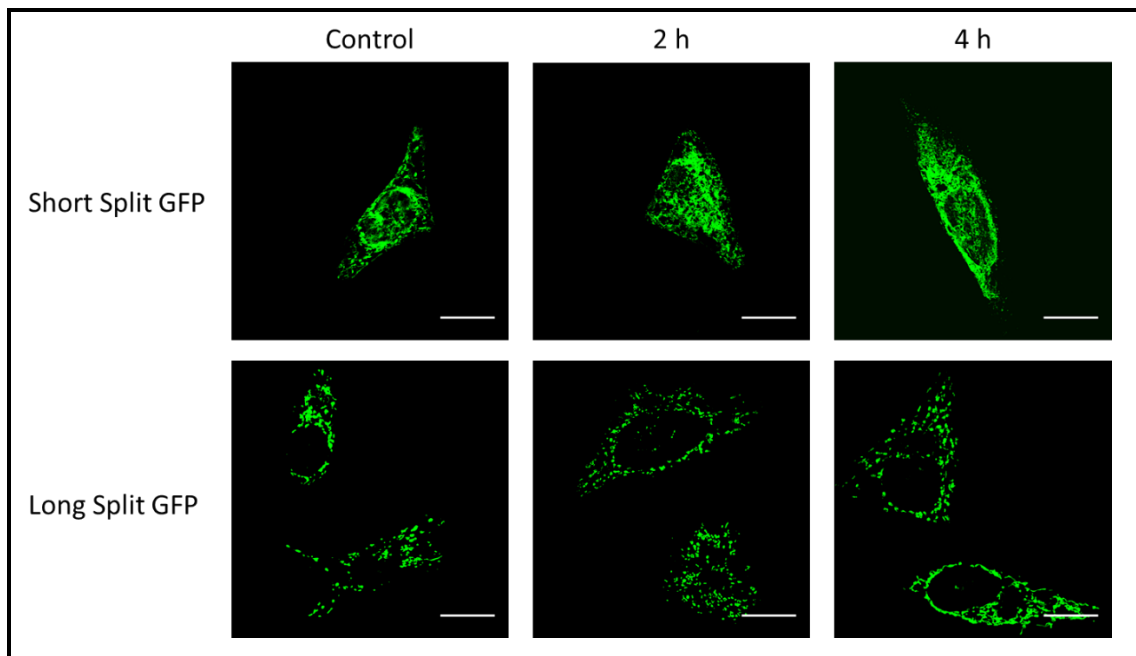


Figura 22. Efecto de doxiciclina 60 μ g/mL sobre los contactos RE-mitocondria evaluados con el sensor Split-GFP en células HeLa. Las células se transfectaron con las dos combinaciones de Split-GFP (OMM GFP β 1-10 + [ER GFP β 11 short o ER GFP β 11 long]) y luego de 24 h, se estimularon con doxiciclina durante los tiempos indicados y se analizaron mediante microscopía confocal, evaluando la emisión luego de excitar a 488 nM. En la figura se muestran imágenes representativas para cada condición. Escala: 20 μ m.

Una vez establecida la correcta expresión de las distintas combinaciones de plásmidos, se realizó el ensayo estimulando con doxiciclina 60 μ g/mL a 2 y 4 h. En la **Figura 22** se muestran imágenes representativas obtenidas para cada condición, donde se puede apreciar que el tratamiento con doxiciclina tiende a aumentar el nivel de fluorescencia con ambos marcadores. Para tener una noción más objetiva del efecto de doxiciclina sobre los contactos RE-mitocondria, se ensayó dos formas de cuantificar las

imágenes obtenidas con Split GFP: por un lado, se midió el porcentaje del área celular ocupado por la fluorescencia, y por otro, el número de objetos fluorescentes por célula (Granatiero et al., 2016), con el fin de determinar el mejor indicador cuantitativo de los contactos. Los resultados indican que ambas formas de cuantificación muestran resultados coherentes con lo observado en las imágenes. Con la combinación de OMM GFP β 1-10 + ER GFP β 11 short se observó un aumento tanto en el área de fluorescencia como en el número de objetos por célula con ambos tiempos de tratamiento con doxiciclina (**Figura 23**), indicando que existe un aumento en el número de puntos de contacto entre RE y mitocondrias como un aumento en la extensión de estos contactos en conjunto.

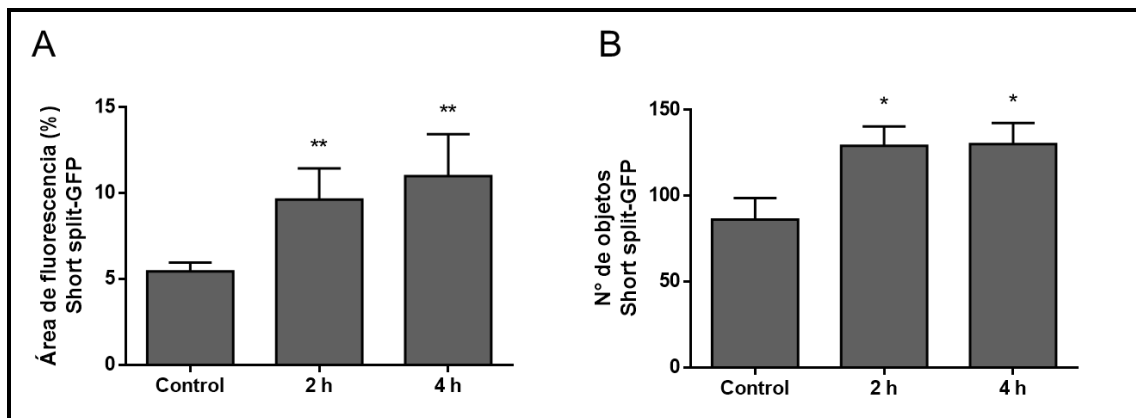


Figura 23. Efecto de doxiciclina 60 μ g/mL sobre los contactos RE-mitocondria evaluados con el sensor short Split-GFP en células HeLa. Las células se transfectaron con la combinación de Split-GFP (OMM GFP β 1-10 + ER GFP β 11 short) durante 24 h, y luego se estimularon con doxiciclina durante los tiempos indicados y se analizaron mediante microscopía confocal, evaluando la emisión luego de excitar a 488 nM. (A) Porcentaje de área de fluorescencia versus área total de las células. (B) Número de objetos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ versus control (n=5). Promedio \pm SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

Con la combinación de OMM GFP β 1-10 + ER GFP β 11 long se obtuvieron resultados muy similares, con un aumento tanto en el área como en el número de objetos luego del estímulo con doxiciclina a 2 y 4 h (**Figura 24**).

Estos resultados, permiten concluir que, además de inducir cambios en el metabolismo celular a tiempos cortos de estimulación, doxiciclina produce cambios en el contacto físico entre RE y mitocondrias.

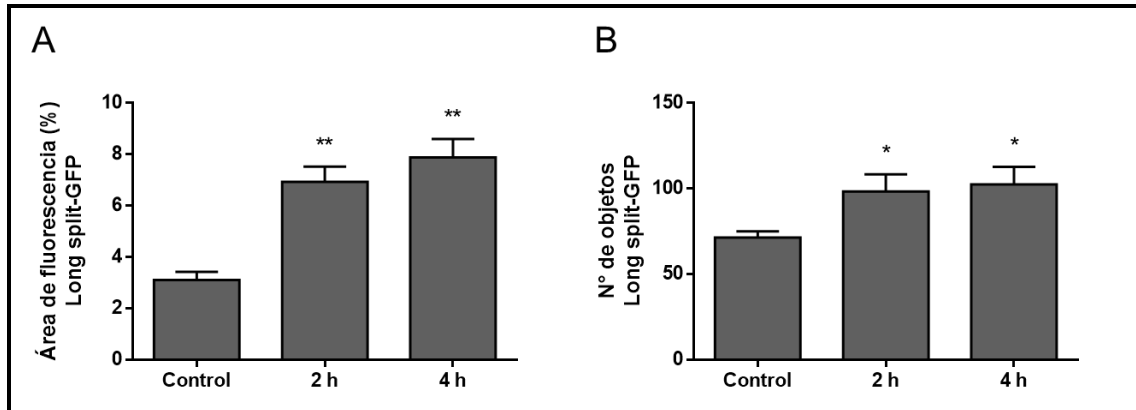


Figura 24. Efecto de doxiciclina 60 µg/mL sobre los contactos RE-mitocondria evaluados con el sensor long Split-GFP en células HeLa. Las células se transfectaron con la combinación de Split-GFP (OMM GFPβ1-10 + ER GFPβ11 long) durante 24 h, y luego se estimularon con doxiciclina durante los tiempos indicados y se analizaron mediante microscopía confocal, evaluando la emisión luego de excitar a 488 nM. (A) Porcentaje de área de fluorescencia versus área total de las células. (B) Número de objetos. * p < 0,05 y ** p < 0,01 versus control (n=5). Promedio ± SEM; Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

6.8. Efecto de la exposición temprana a doxiciclina sobre el acoplamiento funcional entre RE y mitocondria

Luego de determinar que el tratamiento con doxiciclina induce cambios en el acoplamiento físico entre RE y mitocondrias en células HeLa, se investigó si este mayor contacto implica una mayor comunicación funcional. Para este fin, se analizó el traspaso de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria, ya que este es uno de los mejores indicadores de la funcionalidad de dichos contactos (Bravo et al., 2012; Rowland & Voeltz, 2012). Como indicador de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial, se utilizó la proteína fluorescente sensible a Ca^{2+} , Cepia2mt (Suzuki et al., 2014), con destinación a la matriz mitocondrial, y como inductor de la liberación de Ca^{2+} desde el RE se utilizó histamina, la cual actúa a través de la vía de IP_3 . La fluorescencia del sensor Cepia2mt se analizó en tiempo real mediante microscopía confocal.

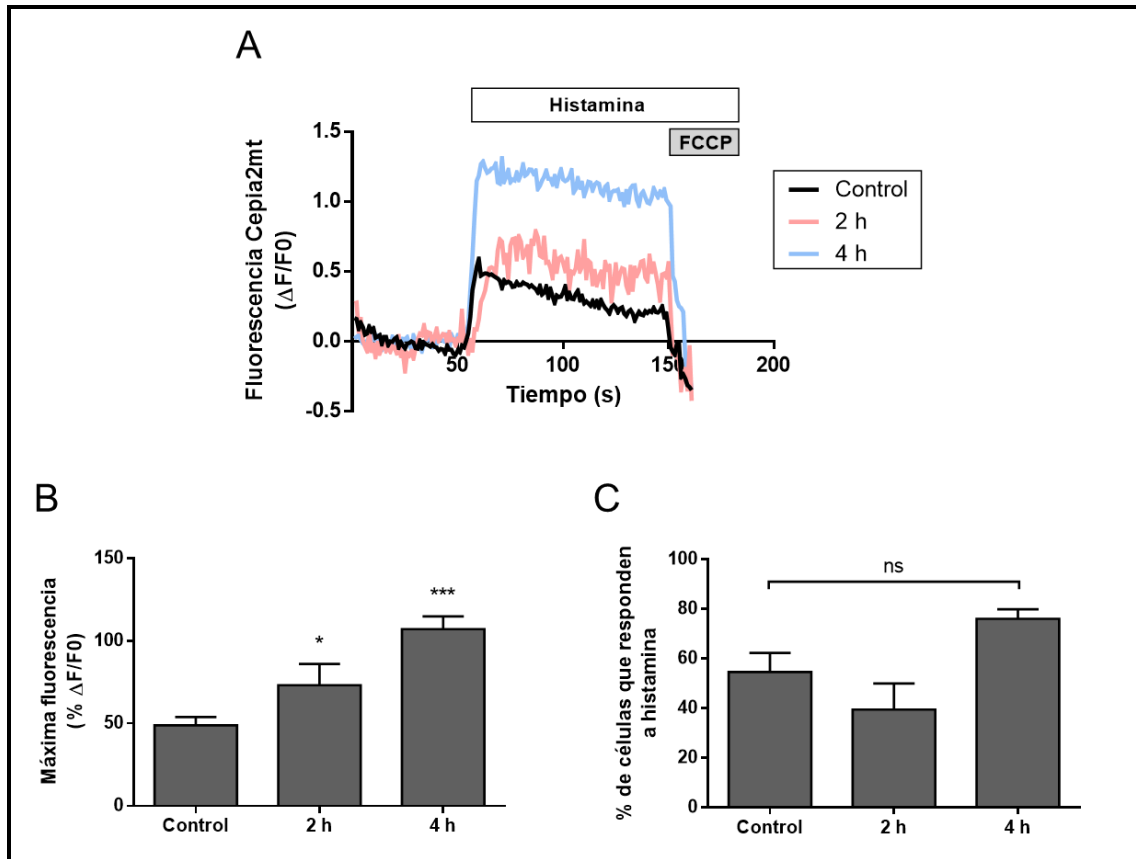


Figura 25. Efecto de doxiciclina 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la captación de Ca^{2+} mitocondrial en células HeLa. Las células se transfirieron con el sensor de Ca^{2+} mitocondrial Cepia2mt durante 24 h, y luego se estimularon con doxiciclina durante los tiempos indicados y se analizaron mediante microscopía confocal. Se evaluó la fluorescencia basal y luego de estimular la salida de Ca^{2+} desde el RE con histamina 100 nM. (A) Cinética representativa. (B) Fluorescencia máxima alcanzada luego del estímulo con histamina. (C) Porcentaje de células que responden frente al estímulo. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ versus control ($n=3$). Promedio \pm SEM; ns: no significativo. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

La histamina, al unirse al receptor H1 ubicado en la membrana plasmática de las células HeLa, activa a la fosfolipasa C, generando los segundos mensajeros DAG e IP_3 . Este último se une al receptor/canal IP_3 (IP_3R) en el RE, estimulando la salida del Ca^{2+} reticular al citosol (Berridge et al., 2003). Si las mitocondrias están en contacto físico con el RE, gran parte del Ca^{2+} liberado es capturado por este último organelo (Bravo-Sagua et al., 2017) y se detecta un incremento menor de este ion en el citosol. Si, por el

contrario, dicho contacto no existe, la mayor parte del Ca^{2+} se vacía al compartimento citosólico y el Ca^{2+} mitocondrial prácticamente no se modifica (Bravo-Sagua et al., 2017; Rizzuto et al., 2012). Por este motivo la histamina se usa como un estímulo para evaluar la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria. La **Figura 25A** muestra que, en las células control, la histamina produjo una rápida elevación de la intensidad de fluorescencia, indicando la entrada de Ca^{2+} hacia la mitocondria, para luego decaer lentamente. Luego de 150 seg de medición se agregó el desacoplante FCCP como control de la técnica, ya que éste, al disipar el potencial de membrana mitocondrial, produce una caída abrupta de la concentración de Ca^{2+} mitocondrial. Al analizar la cinética de las células previamente estimuladas con doxiciclina por 2 h, se observó un mayor aumento relativo de la fluorescencia de Cepia2mt luego de la adición de histamina, la cual se mantuvo elevada durante el resto de la medición (**Figura 25 A-B**). Sin embargo, el cambio más notorio se observó con el tratamiento de 4 h con doxiciclina, el cual presenta una fluorescencia relativa mucho mayor y sostenida en el tiempo (**Figura 25 A-B**). En la cuantificación de la fluorescencia sólo se consideraron las células que presentaron respuesta frente a histamina, por lo tanto, a modo de verificación de las mediciones, se cuantificó el porcentaje de células que responden frente al estímulo con histamina en las tres condiciones experimentales, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ellas (**Figura 25C**).

El sensor Cepia2mt sólo permite cuantificar los niveles de Ca^{2+} mitocondrial de forma relativa, por lo que no permite descartar cambios en la concentración de Ca^{2+} mitocondrial basal o diferencias en la expresión del sensor en las diferentes condiciones experimentales. Por este motivo se repitieron los experimentos de captación de Ca^{2+} mitocondrial utilizando un segundo sensor conocido como mitoGCaMP6m, el cual, al poseer una línea de emisión de fluorescencia independiente de Ca^{2+} , permite normalizar por la cantidad de sensor, y así obtener mediciones normalizadas de la concentración de Ca^{2+} mitocondrial. De acuerdo a lo mostrado en la **Figura 26**, los resultados con el sensor mitoGCaMP6m fueron muy similares a los obtenidos con el sensor Cepia2mt. El tratamiento con doxiciclina aumentó el traspaso de Ca^{2+} desde el RE hacia las mitocondrias, alcanzando una fluorescencia máxima mayor a las 4 h de tratamiento. Al analizar la concentración de Ca^{2+} mitocondrial basal, previo a la estimulación con

histamina, se determinó que ésta no varía de forma significativa en las células tratadas con doxiciclina con respecto a las células control.

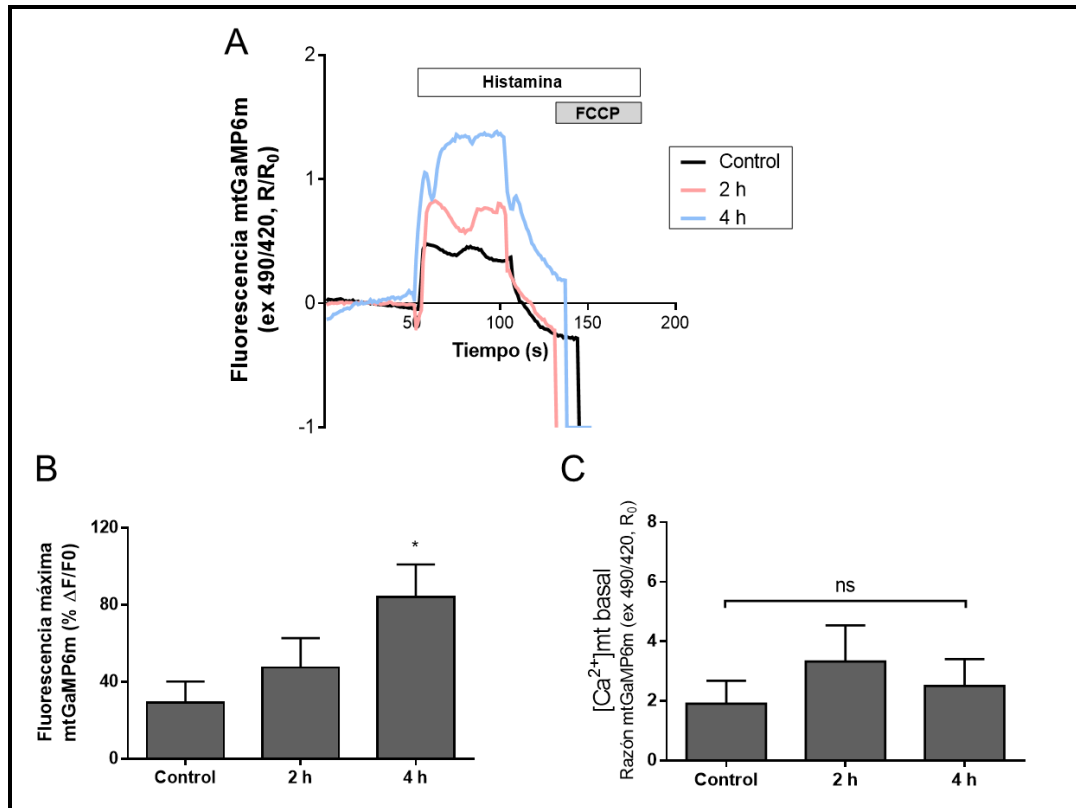


Figura 26. Efecto de doxiciclina 60 µg/mL sobre el Ca²⁺ mitocondrial basal en células HeLa. Las células se transfectaron con el sensor de Ca²⁺ mitocondrial mitoGCaMP6m durante 24 h, y luego se estimularon con doxiciclina durante los tiempos indicados y se analizaron mediante microscopía confocal. Se evaluó la fluorescencia basal y luego de estimular la salida de Ca²⁺ desde el RE con histamina 100 nM. (A) Cinética representativa. (B) Fluorescencia máxima alcanzada luego del estímulo con histamina. (C) Concentración relativa de calcio mitocondrial basal. * p < 0,05 vs control (n=5). Promedio ± SEM; ns: no significativo. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

7. DISCUSIÓN

7.1. Proteostasis y adaptación frente a estrés proteotóxico

Las proteínas son macromoléculas fundamentales para el funcionamiento celular, cumpliendo funciones estructurales, enzimáticas, de transporte, señalización, entre otras (Calamini & Morimoto, 2012). Para poder cumplir con estas funciones, las proteínas requieren de una estructura específica, la cual se logra mediante el plegamiento de su cadena polipeptídica, modificaciones post-traduccionales, cortes proteolíticos, ensamblaje de complejos proteicos, etc (Calamini & Morimoto, 2012; Wolff, Weissman, et al., 2014). La homeostasis proteica o proteostasis comprende todos los procesos implicados en el correcto funcionamiento de las proteínas, incluyendo su síntesis, plegamiento, transporte, hasta su degradación (Calamini & Morimoto, 2012; Wolff, Weissman, et al., 2014). Cuando existe una alteración en la proteostasis, se ponen en marcha respuestas de retroalimentación que buscan restaurar el equilibrio perdido. Estas respuestas se conocen como “respuesta frente a proteínas mal plegadas” o UPR y varían de acuerdo al compartimento subcelular donde se origina la señal de estrés, siendo la más conocida la UPR frente a estrés de RE (Taylor et al., 2014). Tradicionalmente, las UPR se conocen como respuestas de retroalimentación transcripcionales, involucrando la expresión *de novo* de proteínas que actúan como efectores, tales como chaperonas moleculares y proteasas (Taylor et al., 2014). Sin embargo, resultados obtenidos en nuestro Laboratorio muestran que existe una segunda rama de la respuesta, que se da tempranamente, e implica una adaptación metabólica frente al estrés de RE (Bravo et al., 2011, 2012). Esta respuesta metabólica temprana se produce gracias a un acercamiento entre el RE y las mitocondrias, lo cual potencia el metabolismo oxidativo mitocondrial al hacer más eficiente la transferencia de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial, donde actúa como cofactor enzimático (Bravo et al., 2012).

A pesar de las similitudes entre las distintas vías de mantención de la proteostasis, aún se desconoce si esta adaptación metabólica temprana ocurre cuando el estrés se genera en un lugar distinto al RE. Por este motivo, esta tesis investigó si una respuesta

de este tipo existe cuando la acumulación de proteínas mal plegadas tiene lugar dentro de las mitocondrias.

7.2. UPR^{mt} y control de calidad mitocondrial

A pesar de que la UPR^{mt} se describió por primera vez a fines de la década de 1990 (Martinus et al., 1996), aún se desconocen muchos aspectos de esta respuesta, sobre todo en modelos mamíferos. La gran mayoría de la vía de transducción de señales descrita para la UPR^{mt} se ha descubierto en el modelo de *C. elegans*, sin existir siempre homólogos claros en mamíferos para las proteínas participantes. Por este motivo, tampoco existen modelos experimentales bien definidos para inducir esta respuesta *in vitro* en células provenientes de mamíferos. Por lo tanto, el primer objetivo de esta tesis fue definir un modelo experimental apropiado para su uso *in vitro*. Se eligió trabajar con células HeLa, derivadas de un tumor cervicouterino, ya que los trabajos previos realizados en el Laboratorio sobre estrés de RE y contactos RE-mitocondria se realizaron en este modelo celular.

Como primera aproximación, se ensayó el modelo de inducción de UPR^{mt} mediante la expresión de una forma mutante de la proteína OTC, localizada en la matriz mitocondrial (Zhao et al., 2002). Esta mutación corresponde a la delección de una porción del sitio activo de la enzima (Δ OTC), que le permite ser importada a la matriz mitocondrial, pero impide su correcto plegamiento y lleva a la formación de agregados proteicos insolubles (Zhao et al., 2002). La expresión de esta proteína mutante en células COS-7 activa la UPR^{mt}, generando un aumento en la expresión de chaperonas y proteasas mitocondriales (Zhao et al., 2002). Nuestro modelo de trabajo original implicaba el uso de células HeLa-TetON con expresión inducible por doxiciclina del gen de la OTC *wild type*, como control, y de Δ OTC, como inductor de UPR^{mt}. Estas líneas celulares fueron donadas gentilmente por el Dr. Richard J. Youle (NIH, Bethesda, EEUU) (Jin & Youle, 2013).

Al ensayar este modelo con la inducción de las proteínas OTC y Δ OTC mediante el tratamiento con doxiciclina 0,5 μ g/mL, se logró la expresión de ambas proteínas. Sin embargo, la expresión de la proteína control, OTC *wild type*, fue mucho mayor que la de

Δ OTC (datos no mostrados en esta tesis), lo que llevó a que en la línea celular control, los marcadores de estrés tuvieran mayor tendencia al aumento de lo esperado. Esto podría explicarse porque, aunque esta proteína no presenta defectos en su plegamiento, puede estar produciendo estrés celular solamente por la sobrecarga de una proteína exógena. Debido a que este efecto podría confundir la interpretación de los resultados, se decidió cambiar el modelo de inducción de UPR^{mt}. Considerando que, por otra parte, surgieron publicaciones que alertaban sobre el uso de tetraciclinas, familia a la que pertenece la doxiciclina, en investigación por sus efectos negativos sobre la función mitocondrial a largo plazo (Houtkooper et al., 2013; Moullan et al., 2015), se tomó la opción de utilizar directamente la doxiciclina como inductor de UPR^{mt}.

Las tetraciclinas son antibióticos ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones respiratorias, de la piel y gastrointestinales, que actúan a través de la inhibición de la traducción proteica por su unión específica al ribosoma procarionte (Chatzisprou et al., 2015; Moullan et al., 2015). El ribosoma mitocondrial, debido a su origen endosimbionte, es muy similar al de las bacterias y a su vez diferente al ribosoma eucarionte, por lo que las tetraciclinas afectan su función igualmente (Chatzisprou et al., 2015; Moullan et al., 2015). La inhibición de la traducción proteica mitocondrial genera un efecto conocido como desbalance mito-nuclear, en donde la expresión de las subunidades de los complejos de la ETC codificadas en el mtDNA y el DNA nuclear no se encuentran en proporciones estequiométricas para su ensamblaje (Houtkooper et al., 2013; Jovaisaite & Auwerx, 2015; Moullan et al., 2015). Este desbalance genera una acumulación en la mitocondria de las subunidades codificadas en el DNA nuclear, gatillando así el estrés proteotóxico mitocondrial y la UPR^{mt} (Houtkooper et al., 2013; Moullan et al., 2015). Aprovechando este efecto de la doxiciclina, propusimos utilizar el tratamiento de células HeLa con dicho antibiótico como una forma de inducir estrés mitocondrial. Como aproximación inicial, se utilizaron concentraciones de doxiciclina de 15 y 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 0-72 h de tratamiento (Houtkooper et al., 2013).

Utilizando esta estrategia se logró establecer un modelo de desbalance mitonuclear, reduciendo la expresión de una proteína codificada en el mtDNA con respecto a una codificada en el DNA nuclear, ambas pertenecientes a complejos de la ETC, en tiempos entre 24 y 72 h de estímulo (**Figuras 5 y 6**). Paralelamente, este desbalance se

acompaña del aumento en la expresión de genes marcadores de la UPR^{mt}, tal como CHOP, C/EBP β , mtHsp60 y ClpP (**Figuras 7 y 8**). Con estos resultados en conjunto, se puede concluir que se logró establecer un modelo de UPR^{mt} mediante inducción farmacológica en un modelo de líneas celulares humanas.

Para complementar la definición del modelo de UPR^{mt}, se evaluaron algunos efectos a tiempos largos (de hasta 72 h) como la muerte celular y la mitofagia. Con este modelo experimental no existen datos en la literatura sobre estos efectos de toxicidad celular, por lo que no había referencias al respecto al momento de realizar estos experimentos. Como única referencia, existe un trabajo donde se describió la existencia de mitofagia en mitocondrias con mt $\Delta\psi$ preservado, luego de la inducción de la expresión de Δ OTC en el mismo modelo inducible por doxiciclina que se ensayó inicialmente en esta tesis (Jin & Youle, 2013). Sin embargo, como ya se discutió, dicho modelo tiene el problema de que se está causando un estrés dual, ya que por un lado se expresa la proteína mutante Δ OTC, que forma agregados insolubles y, por otra parte, el fármaco utilizado para inducir su expresión, la doxiciclina, tiene por sí sola efectos sobre la expresión de proteína mitocondriales, confundiendo los efectos observados.

En esta tesis sólo se encontró un aumento leve (menor al 10 %) en la población celular PI positiva, lo cual implica alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, al ensayar la concentración de 60 μ g/mL, pero no con la de 15 μ g/mL (**Figuras 10 y 11**). Sin embargo, al estudiar la población apoptótica subG1 no se encontraron aumentos significativos con ninguna de las dos concentraciones (**Figuras 12 y 13**), indicando que este tipo de estrés mitocondrial es leve y no lleva a muerte celular significativa en un plazo de 72 h. Similarmente, tampoco se encontró un aumento significativo de la mitofagia basal según lo testeado con el sensor mitoKeima a la concentración mayor de doxiciclina (**Figura 15**). En conjunto, con estos datos, y recordando el esquema mostrado en la **Figura 2** sobre el control de calidad mitocondrial, se puede concluir que el estrés causado por el tratamiento con doxiciclina a las concentraciones ensayadas se encuentra en los primeros niveles de la escala de control calidad mitocondrial. Sin embargo, queda pendiente en esta tesis evaluar si existen respuestas adaptativas a nivel de aumento en la expresión de enzimas antioxidantes o cambios en la dinámica

mitocondrial, que de acuerdo a la **Figura 2** se encuentran entre la UPR^{mt} y la mitofagia dentro de las respuestas de control de calidad mitocondrial.

7.3. Estrés mitocondrial y metabolismo

Las mitocondrias son organelos que cumplen importantes funciones metabólicas en las células. Además de ser el lugar físico donde ocurre el ciclo de Krebs y la generación de ATP mediante la fosforilación oxidativa, también en la mitocondria tienen lugar reacciones relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, nucleótidos y lípidos (Chandel, 2015). Así, cuando existe estrés mitocondrial por acumulación de proteínas mal plegadas, no sólo es necesario activar vías de respuesta para recuperar la proteostasis, sino que también es necesario mantener o redirigir el metabolismo celular (Lin & Haynes, 2016).

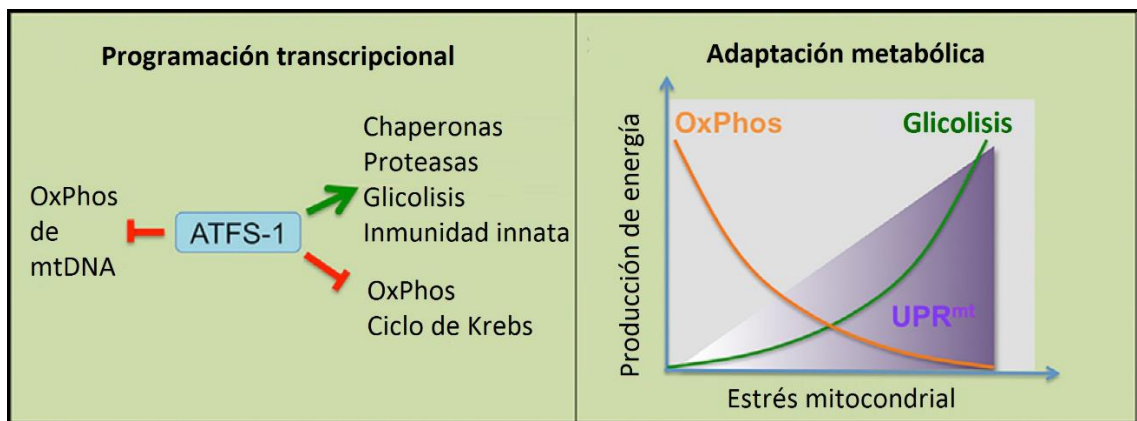


Figura 27. UPR^{mt} y adaptación metabólica. (Izquierda) Reprogramación transcripcional frente a estrés mitocondrial. En el núcleo, ATFS-1 regula la expresión de más de 400 genes, induciendo genes relacionados con la proteostasis mitocondrial, además de la glicolisis y genes relacionados con la inmunidad innata. Por otro lado, ATFS-1 reduce la acumulación de transcritos relacionados con el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (OxPhos). Además, ATFS-1 en la mitocondria reduce la expresión de genes codificados en el mtDNA. (Derecha) Durante la UPR^{mt} se reduce la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa, a la vez que se incrementa la glicolisis para mantener los niveles de ATP. Adaptado de Lin & Haynes, 2016.

En la literatura existen pocos estudios que aborden este tema, y todos ellos utilizan el modelo de *C. elegans* induciendo el estrés mitocondrial de forma crónica. En este contexto, se ha descrito que existe un remodelado del metabolismo celular, potenciando la expresión de genes relacionados con la glicólisis y reduciendo la expresión de genes relacionados con el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (**Figura 27**) (Lin & Haynes, 2016; Nargund et al., 2012, 2015; Schulz & Haynes, 2015). Se propone que este remodelado metabólico tendría como fin evitar la sobrecarga de trabajo de la mitocondria mientras se recupera la homeostasis proteica o prescindir de algunas funciones mitocondriales cuando no se logra recuperar completamente el organelo o el estrés es muy prolongado (Lin & Haynes, 2016; Schulz & Haynes, 2015). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los modelos de trabajo utilizados estudian el estrés crónico y no abordan los posibles cambios metabólicos que podrían ocurrir en un estrés agudo, leve o más cercano a lo que ocurriría en un contexto fisiológico. No obstante, la adaptación celular frente a un estrés crónico no necesariamente es la misma que frente a un estrés agudo. En el caso del estrés mitocondrial, es lógico pensar que frente a una disfunción crónica del organelo se activen otras vías metabólicas a modo de compensación. Pero cuando la alteración es leve y existen posibilidades de recuperar la función de la mitocondria, la adaptación metabólica podría pasar directamente por potenciar la función mitocondrial. En esta tesis se propuso como hipótesis que en una etapa temprana del estrés proteotóxico mitocondrial, incluso antes de ver cambios a nivel de la expresión de genes relacionados con la UPR^{mt}, existe una potenciación del metabolismo mitocondrial y la fosforilación oxidativa, de forma similar a lo que ocurre en el estrés de RE temprano. Con este fin se decidió trabajar a tiempos no mayores a 4 h de tratamiento con doxiciclina, realizando la mayoría de los experimentos a la concentración de 60 µg/mL, que presentó resultados más claros en la estandarización del modelo de UPR^{mt}. En primer lugar, se evaluaron los niveles intracelulares de ATP, encontrándose un aumento significativo a las 2 h de estímulo (**Figura 16**). Este aumento puede deberse a una mayor síntesis de ATP, a una disminución en su consumo, o a una combinación de ambos procesos. De acuerdo al hallazgo de una mayor tasa de consumo de O₂ basal (**Figura 17 y 18**), se puede inferir que podría haber un aumento en la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, no se puede descartar una

posible contribución de un aumento en la tasa de glicolisis. Por otra parte, se sabe que, en situaciones de estrés, disminuyen algunas funciones celulares con el fin de reducir la carga de trabajo y el requerimiento energético. Por ejemplo, durante el estrés por acumulación de proteínas mal plegadas, tanto originado en el RE como en las mitocondrias, existe una reducción de la traducción general de proteínas, para redirigir el gasto de ATP y evitar la sobrecarga de los sistemas de proteostasis y plegamiento proteico (Baker et al., 2012; Harding et al., 1999; Jovaisaite et al., 2014). En esta tesis no se evaluó específicamente esta rama de la señalización de la UPR^{mt}, pero se presume que la reducción de la síntesis general de proteínas podría contribuir a la reducción del requerimiento energético y al aumento de los niveles de ATP intracelular.

7.4. Estrés celular y comunicación entre organelos

Tradicionalmente, se describe que las funciones celulares en organismos eucariontes se encuentran compartimentalizadas en distintos organelos subcelulares. Sin embargo, en las últimas décadas se ha tomado conciencia de que estos organelos no son tan independientes y que interactúan y se comunican constantemente entre sí para coordinar sus funciones (Bravo-Sagua et al., 2014). La comunicación entre organelos se da tanto a nivel físico, por acercamiento y formación de contactos directos, como a través de moléculas señalizadoras. La formación de puentes físicos de contacto entre organelos membranosos permite el traspaso directo de metabolitos, iones u otras moléculas de señalización. Estos contactos entre organelos parecen ser particularmente importante en situaciones de estrés celular, donde se deben activar programas genéticos y metabólicos de adaptación (Bravo-Sagua et al., 2014; Lopez-Crisosto et al., 2017).

En el caso de la mitocondria, se reconoce la comunicación bidireccional, sin contacto directo, con el núcleo donde, por un lado, el núcleo modula la biogénesis y función mitocondrial regulando la expresión de las proteínas destinadas a la mitocondria, y, por otra parte, el núcleo recibe señales desde las mitocondrias como una forma de monitorear su función y promover los ajustes necesarios en la expresión génica (**Figura 28**) (Quirós et al., 2016; Ryan & Hoogenraad, 2007; Whelan & Zuckerbraun, 2013; Wolff, Ladoukakis, Enríquez, et al., 2014). Esta comunicación bidireccional entre

mitocondrias y núcleo se conoce como señalización anterógrada y retrógrada, respectivamente.

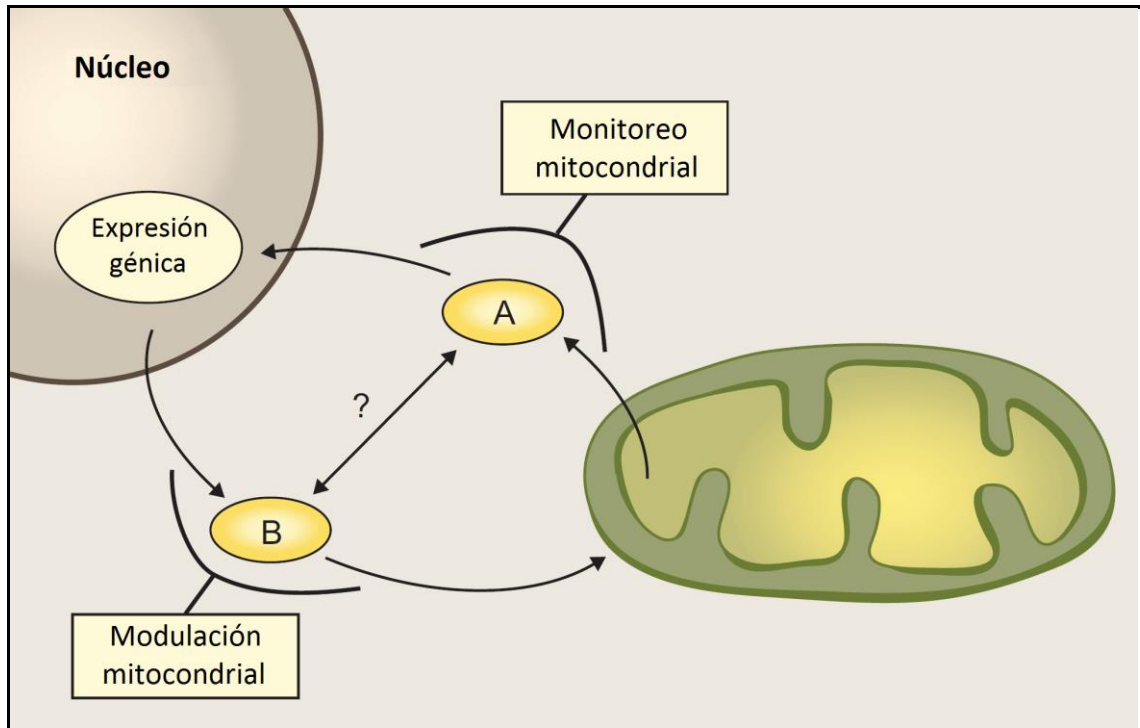


Figura 28. Representación de la comunicación entre núcleo y mitocondrias. La función mitocondrial depende de la señalización anterógrada y retrógrada. La regulación anterógrada (Modulación mitocondrial) integra en el núcleo señales de estímulos externos e internos para activar programas genéticos que ajusten parámetros mitocondriales de acuerdo a estas señales. La regulación retrógrada monitorea el estado funcional de las mitocondrias y señala de vuelta hacia el núcleo (Monitoreo mitocondrial). A y B representan nodos citoplasmáticos que podrían actuar como integradores de las señales anterógradas y retrógradas, con posibles comunicaciones cruzadas entre ellos que permitan una rápida regulación de la función mitocondrial. Adaptado de Battersby & Richter, 2013.

La UPR^{mt} es un claro ejemplo de señalización retrógrada entre las mitocondrias y el núcleo. Aún no está del todo claro cuáles son las señales y la vía de transducción que comunican el estrés por acumulación de proteínas mal plegadas en la mitocondria hacia el núcleo en mamíferos. Sin embargo, distintos trabajos en la literatura, junto con los resultados de esta tesis, muestran el efecto en el aumento de la expresión de genes

relacionados con la proteostasis mitocondrial (Aldridge et al., 2007; Zhao et al., 2002). No obstante, a pesar de desconocer muchos de los aspectos de la comunicación mitocondria/núcleo frente al estrés mitocondrial, en el presente trabajo no se buscó abordar este tema, sino que se tuvo como objetivo estudiar otra rama de la respuesta que involucrara la comunicación entre mitocondrias y RE en este contexto de estrés.

7.5. Estrés mitocondrial y comunicación con el RE

Como se ha descrito en este trabajo, durante las etapas tempranas del estrés mitocondrial inducido por doxiciclina existe un aumento en el metabolismo mitocondrial, lo cual puede deberse a varios factores, como lo son un aumento en la disponibilidad de sustratos metabólicos o una estimulación de las enzimas mitocondriales. La hipótesis de este trabajo apunta a un aumento en la comunicación entre mitocondrias y RE como posible mecanismo que explique esta potenciación metabólica. Diversas enzimas que forman parte del ciclo de Krebs son dependientes de Ca^{2+} , y la acumulación de Ca^{2+} dentro de las mitocondrias requiere de altas concentraciones de este ion en las cercanías del organelo para lograr un ingreso eficiente (Bravo-Sagua et al., 2017). Los sitios de contacto entre RE y mitocondrias constituyen la principal plataforma de traspaso de Ca^{2+} hacia éstas últimas, ya que la salida masiva de Ca^{2+} desde el RE forma micro-dominios espacio-temporales de alta concentración que permiten su captación hacia la matriz mitocondrial (Bravo-Sagua et al., 2017).

Los experimentos realizados en esta tesis muestran que efectivamente existe un aumento en los contactos físicos entre mitocondrias y RE frente al estímulo con doxiciclina, los cuales se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta y una nueva herramienta genética, Split-GFP (**Figura 20, Figuras 22-24**). Estos contactos además son funcionales ya que conllevan un aumento en la eficiencia de traspaso de Ca^{2+} desde el RE a las mitocondrias (**Figura 25**). Sin embargo, queda pendiente estudiar la causalidad entre este fenómeno y el aumento del metabolismo mitocondrial, por ejemplo, inhibiendo el traspaso de Ca^{2+} entre organelos y analizando si se mantiene el aumento en el consumo de oxígeno.

Además, en este trabajo no se definió un posible mecanismo que explique este aumento en la comunicación entre mitocondrias y RE, así como tampoco se abordó una posible relación entre la comunicación mitocondrias-núcleo y mitocondrias-RE. Como antecedente más directo, se sabe que el aumento en los contactos RE-mitocondrias que ocurre en las etapas tempranas del estrés de RE, existe una participación del citoesqueleto que permite el acercamiento de los organelos (Bravo et al., 2011), tema que no fue tratado en este trabajo.

7.6. Distribución de los contactos entre mitocondrias y RE

Además de mostrar el aumento de los contactos entre mitocondrias y RE en etapas tempranas del estrés de RE, nuestro grupo ha descrito, en trabajos relacionados con esta tesis, que estos contactos no siempre se producen de forma homogénea a lo largo del citoplasma. Es así como frente a un estímulo con tunicamicina a bajas concentraciones, el acercamiento entre RE y mitocondrias se produce principalmente en la zona perinuclear (Bravo-Sagua et al., 2016; Bravo et al., 2011). Este evento se puede explicar porque es en esta zona del RE donde ocurre la mayor parte del plegamiento proteico y el acercamiento de las mitocondrias permitiría un suministro directo de ATP a los sitios con mayor requerimiento energético (Bravo-Sagua et al., 2016; Bravo et al., 2011, 2012). En cambio, cuando se induce estrés con rapamicina, un inhibidor de mTORC1 utilizado para simular una situación de privación de nutrientes, igualmente aumentan los contactos entre RE y mitocondrias, pero éstos se dan de forma homogénea a lo largo del citoplasma (Bravo-Sagua et al., 2016). En el caso del estrés originado por doxiciclina, se desconoce si éste se produce homogéneamente en todas las mitocondrias, o si existen poblaciones de mitocondrias más susceptibles que otras. En esta tesis, no se evaluó específicamente si el daño mitocondrial o los contactos entre RE y mitocondrias presenta alguna heterogeneidad en cuanto a su distribución espacial, pero sería algo interesante de estudiar en el futuro.

7.7. Estrés mitocondrial, adaptación y mitohormesis

En la literatura se ha descrito que la activación crónica de la UPR^{mt} promueve la longevidad en diversos modelos, desde invertebrados hasta roedores (Durieux et al., 2011; Houtkooper et al., 2013; Merkwirth et al., 2016; Morrow et al., 2016; Schulz & Haynes, 2015; Tian et al., 2016). Sin embargo, la relación entre UPR^{mt} y longevidad no siempre es tan clara y existe cierta controversia al respecto (Bennett et al., 2014; Bennett & Kaeberlein, 2014; Schulz & Haynes, 2015). Esta controversia se debe en parte a que probablemente la UPR^{mt} no es la única vía que conecta el estrés mitocondrial con la sobrevivencia (Bennett & Kaeberlein, 2014; Schulz & Haynes, 2015). Pero, además existe la noción de que el estrés mitocondrial y la UPR^{mt} tienen un efecto hormético sobre la expectativa de vida de un organismo. Tal como se esquematiza en la **Figura 29**, un nivel de estrés mitocondrial bajo promueve la longevidad por la activación de vías de adaptación y recuperación de la función mitocondrial y de la sobrevivencia. Sin embargo, pasado cierto umbral de daño y disfunción mitocondrial, la sobrevivencia del organismo disminuye por la imposibilidad de recuperar la funcionalidad de las mitocondrias. Esta respuesta bifásica frente al estrés mitocondrial es un claro ejemplo de hormesis y deja en evidencia la necesidad de comprender cómo operan las respuestas adaptativas que promueven la sobrevivencia celular antes de llegar a un daño irreversible, con la consecuente disfunción y muerte celular.

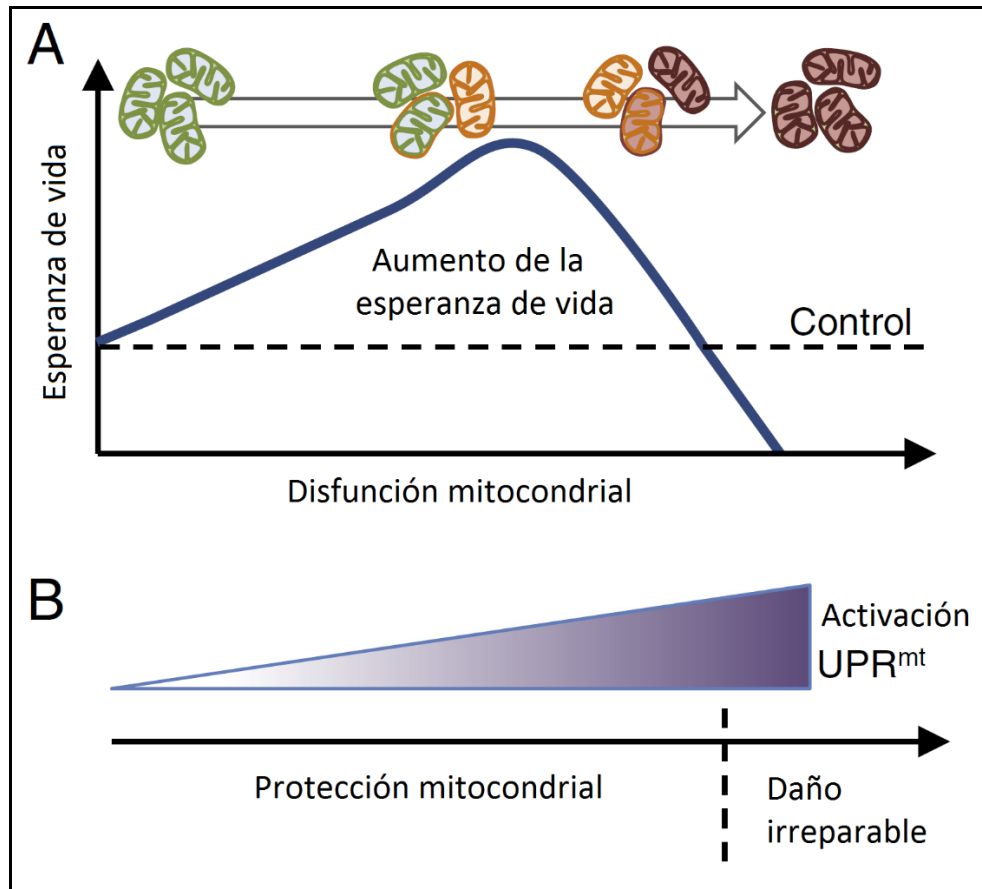


Figura 29. Estrés mitocondrial y regulación de la longevidad. (A) La longevidad aumenta con niveles moderados de disfunción mitocondrial y se reduce cuando el daño es muy severo. Durante la disfunción mitocondrial leve el organismo es capaz de promover la recuperación mitocondrial a través de alteraciones fisiológicas que afectan positivamente la longevidad. Estas adaptaciones incluyen alteraciones metabólicas, la mantención de la proteostasis mitocondrial y la resistencia a patógenos. (B) la UPR^{mt} se activa frente a la disfunción mitocondrial y promueve la reparación del organelo junto con otras adaptaciones metabólicas. En cierto punto (marcado por la línea punteada), el daño mitocondrial se vuelve irreparable, superando los efectos protectores mediados por la UPR^{mt}. Durante la disfunción mitocondrial severa, la UPR^{mt} sigue actuando, pero ya no es suficiente para mantener la homeostasis mitocondrial y promover la sobrevida. Adaptado de Schulz & Haynes, 2015.

Existen algunas evidencias de la activación de la UPR^{mt} en patologías humanas de tipo neurodegenerativo (Beck et al., 2016; Pimenta de Castro et al., 2012), sin embargo, no está clara su posible participación en la patogénesis de estas enfermedades. De acuerdo a lo que se sabe por literatura más los datos de esta tesis, se podría suponer

que la activación de la UPR^{mt} en estas patologías podría cumplir un rol protector al activar vías de supervivencia neuronal.

7.8. Perspectivas

En este trabajo se ha definido un nuevo componente de la respuesta adaptativa frente al estrés mitocondrial, que comprende la potenciación metabólica en etapas tempranas del estrés. De acuerdo al papel protector que tiene la adaptación frente al estrés mitocondrial, se puede inferir que promover esta nueva rama de la respuesta puede ser beneficioso para la supervivencia celular y expectativa de vida de los organismos.

A pesar de que aún se desconocen muchos aspectos de la UPR^{mt}, sobre todo en mamíferos, esta respuesta ya ha sido asociada, en uno u otro sentido, a diversas patologías. Entre estas podemos encontrar el cáncer (Deng & Haynes, 2017; Kenny et al., 2017; Kenny & Germain, 2017; Škrtić et al., 2011); infecciones, sepsis e inflamación (Huang et al., 2012; Liu et al., 2014; Pellegrino et al., 2014; Rath et al., 2012); hipoxia (Kaufman & Crowder, 2015; Mao et al., 2016; Peña et al., 2016); y enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (Beck et al., 2016; Kambe & Miyata, 2015; Pimenta de Castro et al., 2012). Esta cantidad creciente de estudios permite predecir que, en un futuro cercano, la UPR^{mt} será considerada ampliamente dentro de la fisiopatología de distintas enfermedades y, por tanto, las vías de señalización que regulan esta respuesta se propondrán como nuevos blancos terapéuticos. En este contexto surge la importancia de conocer a cabalidad los distintos componentes, tanto genéticos como metabólicos, que comprenden la respuesta frente al estrés mitocondrial, para lograr a futuro maneras eficientes y específicas de manipularla. El trabajo realizado en esta tesis devela una rama de la respuesta frente a estrés mitocondrial no considerada hasta el momento, y que implica la adaptación metabólica en las etapas iniciales de la respuesta adaptativa.

8. CONCLUSIONES

Los principales hallazgos de esta tesis se resumen en los siguientes puntos y en la **Figura 30**.

- Doxyciclina es un estímulo adecuado para inducir la UPR^{mt} *in vitro* en cultivos de células HeLa. El tratamiento con doxyciclina redujo la expresión de una proteína codificada en el mtDNA, en relación a una codificada en el DNA nuclear, produciendo desbalance mito-nuclear, y activando la expresión de genes de respuesta de la UPR^{mt}.
- El estrés mitocondrial inducido por doxyciclina puede considerarse como un estrés leve, ya que no conlleva un aumento en la degradación mitocondrial por mitofagia, ni un aumento significativo de la muerte celular.
- El tratamiento por tiempos cortos con doxyciclina produjo un aumento en el metabolismo celular, manifestado como un incremento en los niveles intracelulares de ATP y de la respiración celular.
- En paralelo a los cambios en el metabolismo celular, se observó un incremento en los contactos, tanto físicos como funcionales, entre mitocondrias y RE. Estos contactos aumentan la eficiencia de la captación de Ca²⁺ hacia la matriz mitocondrial, lo que podría explicar el aumento en la tasa de respiración.

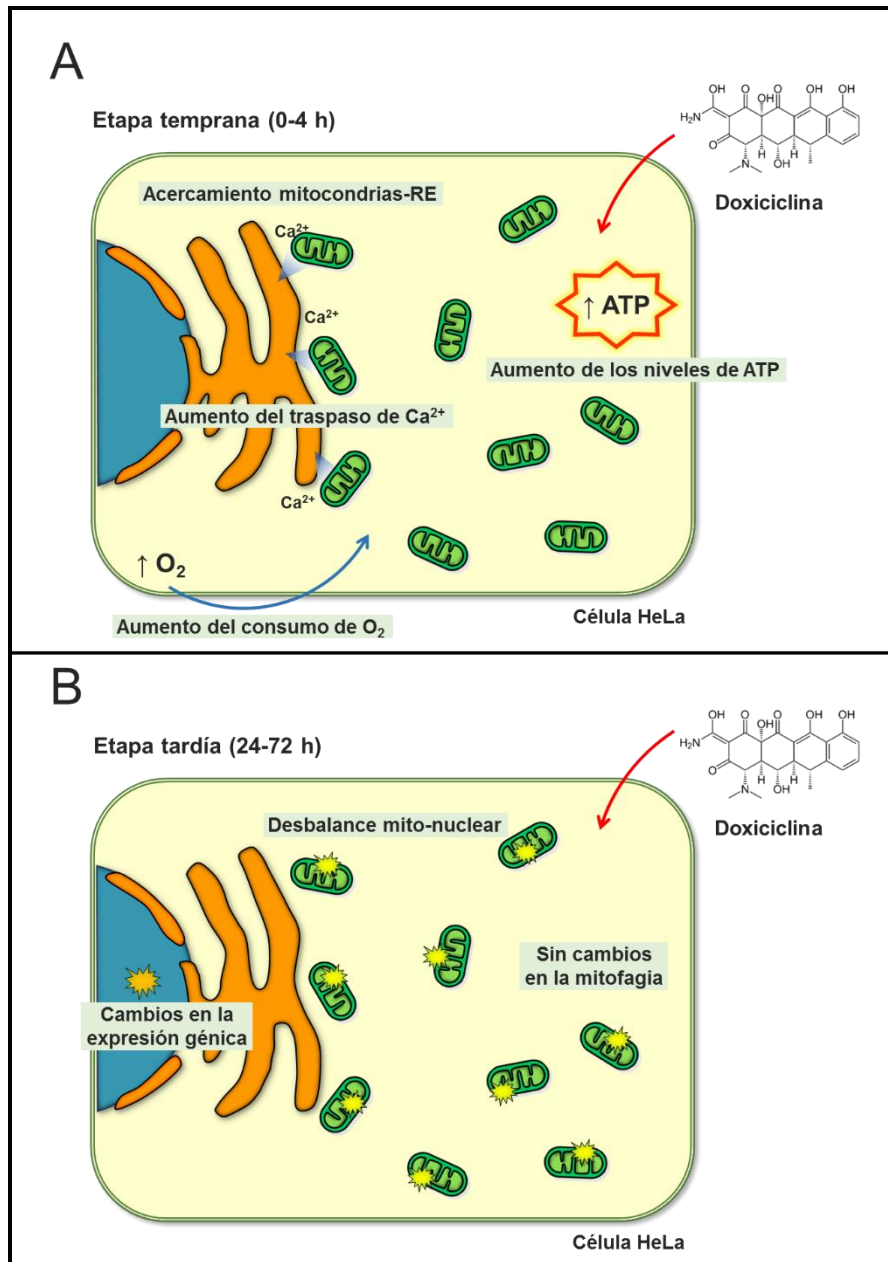


Figura 30. Modelo final. (A) En etapas tempranas del tratamiento con doxiciclina, en células HeLa, se observa un aumento en la cercanía RE-mitocondrias, con un consecuente aumento en la captación de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial luego de la liberación desde el RE. Se propone que este aumento de Ca^{2+} mitocondrial es responsable del aumento en el consumo de O_2 y de los niveles de ATP intracelular. (B) en etapas más avanzadas del tratamiento con doxiciclina se observa un desbalance mitonuclear en la expresión de proteínas de la ETC, junto con un aumento en la expresión de genes marcadores de UPR^{mt}. Sin embargo, no se observan cambios en la degradación de mitocondrias por mitofagia.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Furoukh N; Ianni A; Nolte H; Hölper S; Krüger M; Wanrooij S; & Braun T, 2015, “ClpX stimulates the mitochondrial unfolded protein response (UPR_{mt}) in mammalian cells” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853(10) 2580–2591
- Aldridge J E; Horibe T; & Hoogenraad N J, 2007, “Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements” *PloS one* 2(9) e874
- Andreux P A; Houtkooper R H; & Auwerx J, 2013, “Pharmacological approaches to restore mitochondrial function” *Nature Reviews Drug Discovery* 12(6) 465–483
- Ashrafi G & Schwarz T L, 2013, “The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria” *Cell death and differentiation* 20 31–42
- Baker B M & Haynes C M, 2011, “Mitochondrial protein quality control during biogenesis and aging” *Trends in Biochemical Sciences* 36(5) 254–261
- Baker B M; Nargund A M; Sun T; & Haynes C M, 2012, “Protective coupling of mitochondrial function and protein synthesis via the eIF2a kinase GCN-2” *PLoS genetics* 8(6) e1002760
- Baker M J; Frazier A E; Gulbis J M; & Ryan M T, 2007, “Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function” *Trends in Cell Biology* 17(9) 456–464
- Baker M J; Tatsuta T; & Langer T, 2011, “Quality control of mitochondrial proteostasis” *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(7) pii: a007559
- Barbour J A & Turner N, 2014, “Mitochondrial stress signaling promotes cellular adaptations” *International journal of cell biology* 2014:15602 doi: 10.1155/2014/156020.
- Battersby B J & Richter U, 2013, “Why translation counts for mitochondria – retrograde signalling links mitochondrial protein synthesis to mitochondrial biogenesis and cell

- proliferation" *Journal of cell science* 126(Pt 19) 4331–4338
- Beck J; Mufson E; & Counts S, 2016, "Evidence for mitochondrial UPR gene activation in familial and sporadic Alzheimer's disease" *Current Alzheimer research* 13(6) 610–614
- Benedetti C; Haynes C M; Yang Y; Harding H P; & Ron D, 2006, "Ubiquitin-like protein 5 positively regulates chaperone gene expression in the mitochondrial unfolded protein response" *Genetics* 174 229–239
- Bennett C F & Kaeberlein M, 2014, "The mitochondrial unfolded protein response and increased longevity: Cause, consequence, or correlation?" *Experimental Gerontology* 56 142–146
- Bennett C F; Vander Wende H; Simko M; Klum S; Barfield S; Choi H; Pineda V V; & Kaeberlein M, 2014, "Activation of the mitochondrial unfolded protein response does not predict longevity in *Caenorhabditis elegans*" *Nature communications* 5(206) 3483
- Bernard C, 1974 *Lectures on the phenomena common to animals and plants*
- Berridge M J; Bootman M D; & Roderick H L, 2003, "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling" *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(7) 517–529
- Bradford M, 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Analytical biochemistry* 72 248–254
- Bravo-Sagua R; López-Crisosto C; Parra V; Rodríguez-Peña M; Rothermel B A; Quest A F G; & Lavandero S, 2016, "mTORC1 inhibitor rapamycin and ER stressor tunicamycin induce differential patterns of ER-mitochondria coupling" *Scientific Reports* 6(October) 36394
- Bravo-Sagua R; Parra V; Lopez-Crisosto C; Díaz P; Quest A F; & Lavandero S, 2017, "Calcium transport and signaling in mitochondria" *Comprehensive physiology* 7(2) 623–634

- Bravo-Sagua R; Rodriguez A E; Kuzmicic J; Gutierrez T; Lopez-Crisosto C; Quiroga C; Díaz-Elizondo J; Chiong M; Gillette T G; Rothermel B A; & Lavandero S, 2013, "Cell death and survival through the endoplasmic reticulum-mitochondrial axis" *Current molecular medicine* 13(2) 317–329
- Bravo-Sagua R; Torrealba N; Paredes F; Morales P E; Pennanen C; López-Crisosto C; Troncoso R; Criollo A; Chiong M; Hill J A; Simmen T; Quest A F; & Lavandero S, 2014, "Organelle communication: signaling crossroads between homeostasis and disease" *The international journal of biochemistry & cell biology* 50 55–59
- Bravo R; Gutierrez T; Paredes F; Gatica D; Rodriguez A E; Pedrozo Z; Chiong M; Parra V; Quest A F G; Rothermel B A; & Lavandero S, 2012, "Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics" *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44(1) 16–20
- Bravo R; Parra V; Gatica D; Rodriguez A E; Torrealba N; Paredes F; Wang Z V.; Zorzano A; Hill J A; Jaimovich E; Quest A F G; & Lavandero S, 2013, "Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration" *International Review of Cell and Molecular Biology* 301 215–290
- Bravo R; Vicencio J M; Parra V; Troncoso R; Muñoz J P; Bui M; Quiroga C; Rodriguez A E; Verdejo H E; Ferreira J; Iglewski M; Chiong M; Simmen T; Zorzano A; Hill J A; Rothermel B A; Szabadkai G; & Lavandero S, 2011, "Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress" *Journal of Cell Science* 124(Pt 13) 2143–2152
- Broadley S A & Hartl F U, 2008, "Mitochondrial stress signaling: a pathway unfolds" *Trends in Cell Biology* 18(1) 1–4
- Cabantous S; Terwilliger T C; & Waldo G S, 2005, "Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein" *Nature Biotechnology* 23(1) 102–107
- Calabrese E & Baldwin L, 2002, "Defining hormesis" *Human & Experimental Toxicology* 21 91–97

- Calamini B & Morimoto R I, 2012, "Protein homeostasis as a therapeutic target for diseases of protein conformation" *Current topics in medicinal chemistry* 12(22) 2623–2640
- del Campo A; Parra V; Vásquez-Trincado C; Gutiérrez T; Morales P E; López-Crisosto C; Bravo-Sagua R; Navarro-Marquez M F; Verdejo H E; Contreras-Ferrat A; Troncoso R; Chiong M; & Lavandero S, 2014, "Mitochondrial fragmentation impairs insulin-dependent glucose uptake by modulating Akt activity through mitochondrial Ca²⁺ uptake" *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 306(1) E1–E13
- Cárdenas C; Miller R A; Smith I; Bui T; Molgó J; Müller M; Vais H; Cheung K-H; Yang J; Parker I; Thompson C B; Birnbaum M J; Hallows K R; & Foskett J K, 2010, "Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria" *Cell* 142(2) 270–283
- Chan D C, 2006, "Mitochondrial fusion and fission in mammals" *Annual review of cell and developmental biology* 22 79–99
- Chandel N S, 2015, "Evolution of mitochondria as signaling organelles" *Cell Metabolism* 22(2) 204–206
- Chatzisprou I A; Held N M; Mouchiroud L; Auwerx J; & Houtkooper R H, 2015, "Tetracycline antibiotics impair mitochondrial function and its experimental use confounds research" *Cancer Research* 75(21) 4446–4449
- Copeland J M; Cho J; Lo T; Hur J H; Bahadorani S; Arabyan T; Rabie J; Soh J; & Walker D W, 2009, "Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain" *Current Biology* 19(19) 1591–1598
- Couvillion M T; Soto I C; Shipkovenska G; & Churchman L S, 2016, "Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs" *Nature* 533(1) 1–17
- Csordás G & Hajnóczky G, 2009, "SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS" *Biochimica et biophysica acta* 1787(11) 1352–62
- Deas E; Plun-Favreau H; Gandhi S; Desmond H; Kjaer S; Loh S H Y; Renton A E M;

- Harvey R J; Whitworth A J; Martins L M; Abramov A Y; & Wood N W, 2011, "PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL" *Human molecular genetics* 20(5) 867–879
- Deng P & Haynes C M, 2017, "Mitochondrial dysfunction in cancer: Potential roles of ATF5 and the mitochondrial UPR" *Seminars in Cancer Biology* S1044–579X(17) 30125–30126
- Dillin A; Hsu A-L; Arantes-Oliveira N; Lehrer-Graiwer J; Hsin H; Fraser A G; Kamath R S; Ahringer J; & Kenyon C, 2002, "Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development" *Science (New York, N.Y.)* 298 2398–2401
- Durieux J; Wolff S; & Dillin A, 2011, "The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity" *Cell* 144 79–91
- Fiorese C J; Schulz A M; Lin Y F; Rosin N; Pellegrino M W; & Haynes C M, 2016, "The transcription factor ATF5 mediates a mammalian mitochondrial UPR" *Current Biology* 26(15) 2037–2043
- Giorgi C; De Stefani D; Bononi A; Rizzuto R; & Pinton P, 2009, "Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum" *The international journal of biochemistry & cell biology* 41 1817–1827
- Granatiero V; Giorgio V; Cali T; Patron M; Brini M; Bernardi P; Tiranti V; Zeviani M; Pallafacchina G; De Stefani D; & Rizzuto R, 2016, "Reduced mitochondrial Ca²⁺ transients stimulate autophagy in human fibroblasts carrying the 13514A>G mutation of the ND5 subunit of NADH dehydrogenase" *Cell Death and Differentiation* 23(2) 231–241
- Gutiérrez T; Parra V; Troncoso R; Pennanen C; Contreras-Ferrat A; Vasquez-Trincado C; Morales P E; Lopez-Crisosto C; Sotomayor-Flores C; Chiong M; Rothermel B A; & Lavandero S, 2014, "Alteration in mitochondrial Ca²⁺ uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes" *Cell Communication and Signaling* 12(1) 68

- Hailong L; Wang X; Zhang N; Gottipati M K; Parpura V; & Ding S, 2014, "Imaging of mitochondrial Ca²⁺ dynamics in astrocytes using cell-specific mitochondria-targeted GCaMP5G/6s: Mitochondrial Ca²⁺ uptake and cytosolic Ca²⁺ availability via the endoplasmic reticulum store" *Cell Calcium* 56(6) 457–466
- Harbauer A B; Zahedi R P; Sickmann A; Pfanner N; & Meisinger C, 2014, "The protein import machinery of mitochondria-a regulatory hub in metabolism, stress, and disease" *Cell metabolism* 19(3) 357–372
- Harding H P; Zhang Y; & Ron D, 1999, "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase" *Nature* 397(6716) 271–274
- Haynes C M; Fiorese C J; & Lin Y-F, 2013, "Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond" *Trends in Cell Biology* 23(7) 311–318
- Haynes C M; Petrova K; Benedetti C; Yang Y; & Ron D, 2007, "ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*" *Developmental cell* 13(October) 467–480
- Haynes C M & Ron D, 2010, "The mitochondrial UPR – protecting organelle protein homeostasis" *Journal of Cell Science* 123(22) 3849–3855
- Haynes C M; Yang Y; Blais S P; Neubert T A; & Ron D, 2010, "The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*" *Molecular Cell* 37(4) 529–540
- Horibe T & Hoogenraad N J, 2007, "The Chop gene contains an element for the positive regulation of the mitochondrial unfolded protein response" *PloS one* 2(9) e835
- Houtkooper R H; Mouchiroud L; Ryu D; Moullan N; Katsyuba E; Knott G; Williams R W; & Auwerx J, 2013, "Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism" *Nature* 497 451–457
- Huang L; Dong H; Chuang I; Liu M; & Yang R-C, 2012, "Attenuation of mitochondrial unfolded protein response is associated with hepatic dysfunction in septic rats" *Shock (Augusta, Ga.)* 38(6) 642–8

- Ibarra C; Vicencio J M; Estrada M; Lin Y; Rocco P; Rebellato P; Munoz J P; Garcia-Prieto J; Quest A F G; Chiong M; Davidson S M; Bulatovic I; Grinnemo K H; Larsson O; Szabadkai G; Uhlén P; Jaimovich E; & Lavandero S, 2013, “Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulin-like growth factor 1 receptors” *Circulation Research* 112(2) 236–245
- Ikeda Y; Shirakabe A; Maejima Y; Zhai P; Sciarretta S; Toli J; Nomura M; Mihara K; Egashira K; Ohishi M; Abdellatif M; & Sadoshima J, 2015, “Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress” *Circulation Research* 116(2) 264–278
- Jin S M; Lazarou M; Wang C; Kane L A; Narendra D P; & Youle R J, 2010, “Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL” *Journal of Cell Biology* 191(5) 933–942
- Jin S M & Youle R J, 2013, “The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2 / Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria” *Autophagy* 9(11) 1750–1757
- Jovaisaite V & Auwerx J, 2015, “The mitochondrial unfolded protein response-synchronizing genomes” *Current Opinion in Cell Biology* 33 74–81
- Jovaisaite V; Mouchiroud L; & Auwerx J, 2014, “The mitochondrial unfolded protein response , a conserved stress response pathway with implications in health and disease” *The Journal of Experimental Biology* 217 137–143
- Kambe Y & Miyata A, 2015, “Potential involvement of the mitochondrial unfolded protein response in depressive-like symptoms in mice” *Neuroscience Letters* 588 166–171
- Kamer K J & Mootha V K, 2015, “The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter” *Nature reviews. Molecular cell biology* 16(9) 545–553
- Karpac J & Jasper H, 2013, “Aging: Seeking mitonuclear balance” *Cell* 154(2) 271–273
- Kaufman D M & Crowder C M, 2015, “Mitochondrial proteostatic collapse leads to hypoxic injury” *Current Biology* 25(16) 2171–2176

- Kenny T C & Germain D, 2017, "mtDNA, metastasis, and the mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt})" *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5(April) 37
- Kenny T C; Hart P; Ragazzi M; Sersinghe M; Chipuk J; Sagar M A K; Eliceiri K W; LaFramboise T; Grandhi S; Santos J; Riar A K; Papa L; D'Aurello M; Manfredi G; Bonini M G; & Germain D, 2017, "Selected mitochondrial DNA landscapes activate the SIRT3 axis of the UPR^{mt} to promote metastasis" *Oncogene* Epub ahead 1–12
- Kirichok Y; Krapivinsky G; & Clapham D E, 2004, "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel" *Nature* 427 360–364
- Kirstein-Miles J & Morimoto R I, 2010, "Peptides signal mitochondrial stress" *Cell Metabolism* 11 177–178
- Kornmann B, 2013, "The molecular hug between the ER and the mitochondria" *Current opinion in cell biology* 25(4) 443–448
- Kornmann B, 2014, "Quality control in mitochondria: use it, break it, fix it, trash it" *F1000prime reports* 6(15) doi: 10.12703/P6-15
- Kotiadis V N; Duchen M R; & Osellame L D, 2013, "Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health" *BBA - General Subjects* 1840(4) 1254–1265
- Kuzmicic J; Del Campo A; López-Crisosto C; Morales P E; Pennanen C; Bravo-Sagua R; Hechenleitner J; Zepeda R; Castro P F; Verdejo H E; Parra V; Chiong M; & Lavandero S, 2011, "Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure" *Revista española de cardiología* 64(10) 916–923
- Latorre-Pellicer A; Moreno-Loshuertos R; Lechuga-Vieco A V; Sánchez-Cabo F; Torroja C; Acín-Pérez R; Calvo E; Aix E; González-Guerra A; Logan A; Bernad-Miana M L; Romanos E; Cruz R; Cogliati S; Sobrino B; Carracedo Á; Pérez-Martos A; Fernández-Silva P; Ruíz-Cabello J; Murphy M P; et al., 2016, "Mitochondrial and nuclear DNA matching shapes metabolism and healthy ageing" *Nature* 535(7613) 561–565
- Lee J & Ozcan U, 2014, "Unfolded protein response signaling and metabolic diseases."

The Journal of Biological Chemistry 289(3) 1203–1211

Lin Y & Haynes C M, 2016, “Metabolism and the UPR(mt)” *Molecular cell* 61(5) 677–682

Lindquist S, 1986, “The heat-shock response” *Annual review of biochemistry* 55 1151–1191

Liu Y; Samuel B S; Breen P C; & Ruvkun G, 2014, “Caenorhabditis elegans pathways that surveil and defend mitochondria” *Nature* 508(7496) 406–410

López-Crisosto C; Bravo-Sagua R; Rodriguez-Peña M; Mera C; Castro P F; Quest A F G; Rothermel B A; Cifuentes M; & Lavandero S, 2015, “ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1852(10) 2096–2105

Lopez-Crisosto C; Pennanen C; Vasquez-Trincado C; Morales P E; Bravo-Sagua R; Quest A F G; Chiong M; & Lavandero S, 2017, “Sarcoplasmic reticulum–mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology” *Nature Reviews Cardiology* 14(6) 342–360

López-Otín C; Blasco M A; Partridge L; Serrano M; & Kroemer G, 2013, “The hallmarks of aging” *Cell* 153(6) 1194–1217

Mao X R; Kaufman D M; & Crowder C M, 2016, “Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase promotes hypoxic survival by activating the mitochondrial unfolded protein response” *Cell Death and Disease* 7(2) e2113

Martinus R D; Garth G P; Webster T L; Cartwright P; Naylor D J; Hoj P B; & Hoogenraad N J, 1996, “Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome” *European Journal of Biochemistry* 240 98–103

McBride H M; Neuspiel M; & Wasiak S, 2006, “Mitochondria: more than just a powerhouse” *Current biology : CB* 16(14) R551-60

Merkwirth C; Jovaisaite V; Durieux J; Matilainen O; Jordan S D; Quiros P M; Steffen K; Williams E; Mouchiroud L; Tronnes S; Murillo V; Wolff S; Shaw R; & Dillin A, 2016, “Two conserved histone demethylases regulate mitochondrial stress-induced

longevity" *Cell* 165(5) 1209–1223

Mick D U; Fox T D; & Rehling P, 2011, "Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation" *Nature reviews. Molecular cell biology* 12(1) 14–20

Mizushima N & Komatsu M, 2011, "Autophagy: renovation of cells and tissues." *Cell* 147(4) 728–41

Morrow G; Kim H; Pellerito O; Bourrelle-Langlois M; Le Pecheur M; Groebe K; & Tanguay R M, 2016, "Changes in *Drosophila* mitochondrial proteins following chaperone-mediated lifespan extension confirm a role of Hsp22 in mitochondrial UPR and reveal a mitochondrial localization for cathepsin D" *Mechanisms of Ageing and Development* 155 36–47

Moullan N; Mouchiroud L; Wang X; Ryu D; Williams E G; Mottis A; Jovaisaite V; Frochaux M V.; Quiros P M; Deplancke B; Houtkooper R H; & Auwerx J, 2015, "Tetracyclines disturb mitochondrial function across eukaryotic models: a call for caution in biomedical research" *Cell Reports* 10 1681–1691

Narendra D P; Jin S M; Tanaka A; Suen D-F; Gautier C A; Shen J; Cookson M R; & Youle R J, 2010, "PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin" *PLoS biology* 8(1) e1000298

Nargund A M; Fiorese C J; Pellegrino M W; Deng P; & Haynes C M, 2015, "Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATFS-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt)" *Molecular Cell* 58(1) 123–133

Nargund A M; Pellegrino M W; Fiorese C J; Baker B M; & Haynes C M, 2012, "Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation" *Science (New York, N.Y.)* 337 587–590

Osiewacz H D & Bernhardt D, 2013, "Mitochondrial quality control: impact on aging and life span" *Gerontology* 59 413–420

Owusu-Ansah E; Song W; & Perrimon N, 2013, "Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling" *Cell* 155(3) 699–712

- Pellegrino M W; Nargund A M; & Haynes C M, 2013, "Signaling the mitochondrial unfolded protein response" *BBA - Molecular Cell Research* 1833 410–416
- Pellegrino M W; Nargund A M; Kirienko N V.; Gillis R; Fiorese C J; & Haynes C M, 2014, "Mitochondrial UPR-regulated innate immunity provides resistance to pathogen infection" *Nature* 516(7531) 414–417
- Peña S; Sherman T; Brookes P S; & Nehrke K, 2016, "The mitochondrial unfolded protein response protects against anoxia in caenorhabditis elegans" *PLoS ONE* 11(7) 1–16
- Pernas L & Scorrano L, 2016, "Mito-Morphosis: Mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function" *Annual review of physiology* 78(1) 505–531
- Pfaffl M W, 2001, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR" *Nucleic Acids Research* 29(9) 16–21
- Pimenta de Castro I; Costa A C; Lam D; Tufi R; Fedele V; Moiso N; Dinsdale D; Deas E; Loh S H Y; & Martins L M, 2012, "Genetic analysis of mitochondrial protein misfolding in *Drosophila melanogaster*" *Cell Death and Differentiation* 19(8) 1308–1316
- Quirós P M; Langer T; & López-Otín C, 2015, "New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease" *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(6) 345–359
- Quirós P M; Mottis A; & Auwerx J, 2016, "Mitonuclear communication in homeostasis and stress" *Nature reviews. Molecular cell biology* 17(4) 213–226
- Rampelt H & Pfanner N, 2016, "Coordination of two genomes by mitochondrial translational plasticity" *Cell* 167(2) 308–310
- Rath E; Berger E; Messlik A; Nunes T; Liu B; Kim S C; Hoogenraad N J; Sans M; Sartor R B; & Haller D, 2012, "Induction of dsRNA-activated protein kinase links mitochondrial unfolded protein response to the pathogenesis of intestinal inflammation" *Gut* 61(9) 1269–1278
- Rauthan M; Ranji P; Aguilera Pradenas N; Pitot C; & Pilon M, 2013, "The mitochondrial

- unfolded protein response activator ATFS-1 protects cells from inhibition of the mevalonate pathway” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(15) 5981–6
- Richter-Dennerlein R; Dennerlein S; & Rehling P, 2015, “Integrating mitochondrial translation into the cellular context” *Nature Publishing Group* 16(10) 586–592
- Richter-Dennerlein R; Oeljeklaus S; Lorenzi I; Ronsor C; Bareth B; Schendzielorz A B; Wang C; Warscheid B; Rehling P; & Dennerlein S, 2016, “Mitochondrial protein synthesis adapts to influx of nuclear-encoded protein” *Cell* 167(2) 471–483.e10
- Rizzuto R; De Stefani D; Raffaello A; & Mammucari C, 2012, “Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 566–578
- Rowland A A & Voeltz G K, 2012, “Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(10) 607–615
- Ryan M T & Hoogenraad N J, 2007, “Mitochondrial-nuclear communications” *Annual review of biochemistry* 76 701–722
- Schulz A M & Haynes C M, 2015, “UPR(mt)-mediated cytoprotection and organismal aging” *BBA - Bioenergetics* 1847(11) 1448–1456
- Shirakabe A; Fritzky L; Saito T; Zhai P; Miyamoto S; Gustafsson Å B; Kitsis R N; & Sadoshima J, 2016, “Evaluating mitochondrial autophagy in the mouse heart” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 92 134–139
- Škrtić M; Sriskanthadevan S; Jhas B; Gebbia M; Wang X; Wang Z; Hurren R; Jitkova Y; Gronda M; Maclean N; Lai C K; Eberhard Y; Bartoszko J; Spagnuolo P; Rutledge A C; Datti A; Ketela T; Moffat J; Robinson B H; Cameron J H; et al., 2011, “Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia” *Cancer Cell* 20(5) 674–688
- De Stefani D; Raffaello A; Teardo E; Szabo I; & Rizzuto R, 2011, “A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter” *Nature* 476(7360) 336–340

- Sun N; Yun J; Liu J; Malide D; Liu C; Rovira I I; Holmstrom K M; Fergusson M M; Yoo Y H; Combs C A; & Finkel T, 2015, "Measuring in vivo mitophagy" *Molecular Cell* 60(4) 685–696
- Suzuki J; Kanemaru K; Ishii K; Ohkura M; Okubo Y; & Iino M, 2014, "Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA" *Nature communications* 5(May) 4153
- Taylor R C; Berendzen K M; & Dillin A, 2014, "Systemic stress signalling: understanding the cell non-autonomous control of proteostasis" *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(3) 211–217
- Thomas R E; Andrews L A; Burman J L; Lin W-Y; & Pallanck L J, 2014, "PINK1-Parkin pathway activity is regulated by degradation of PINK1 in the mitochondrial matrix" *PLoS Genetics* 10(5) e1004279
- Tian Y; Garcia G; Bian Q; Steffen K; Joe L; Wolff S; Meyer B J; & Dillin A, 2016, "Mitochondrial stress induces chromatin reorganization to promote longevity and UPR(mt)" *Cell* 165(5) 1197–1208
- 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; & Shirihai O S, 2008, "Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy" *The EMBO journal* 27(2) 433–446
- Vögtle F-N & Meisinger C, 2012, "Sensing mitochondrial homeostasis: the protein import machinery takes control" *Developmental cell* 23 234–236
- Wallace D C, 2016, "Mitochondrial DNA in evolution and disease" *Nature* 535(7613) 498–500
- Whelan S P & Zuckerman B S, 2013, "Mitochondrial signaling: forwards, backwards, and in between" *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* doi: 10.1155/2013/351613.
- Wolff J N; Ladoukakis E D; Enriquez J a.; & Dowling D K, 2014, "Mitonuclear interactions: evolutionary consequences over multiple biological scales" *Philosophical*

Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 369(1646) 20130443–20130443

Wolff J N; Ladoukakis E D; Enríquez J A; & Dowling D K, 2014, “Mitonuclear interactions: evolutionary consequences over multiple biological scales” *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological sciences* 369(1646) 20130443

Wolff S & Dillin A, 2013, “Beneficial miscommunication” *Nature* 497 442–443

Wolff S; Weissman J S; & Dillin A, 2014, “Differential scales of protein quality control” *Cell* 157(1) 52–64

Wrighton K H, 2013, “Ageing: a little bit of stress does you good” *Nature reviews. Molecular cell biology* 14(12) 749

Yang Z & Klionsky D J, 2010, “Eaten alive: a history of macroautophagy” *Nature cell biology* 12(9) 814–822

Yoneda T; Benedetti C; Urano F; Clark S G; Harding H P; & Ron D, 2004, “Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones” *Journal of cell science* 117(18) 4055–4066

Youle R J & van der Bliek A M, 2012, “Mitochondrial fission, fusion, and stress” *Science (New York, N.Y.)* 337(6098) 1062–1065

Youle R J & Narendra D P, 2011, “Mechanisms of mitophagy” *Nature reviews. Molecular cell biology* 12(1) 9–14

Yun J & Finkel T, 2014, “Mitohormesis” *Cell metabolism* 19(5) 757–766

Zhao Q; Wang J; Levichkin I V; Stasinopoulos S; Ryan M T; & Hoogenraad N J, 2002, “A mitochondrial specific stress response in mammalian cells” *The EMBO journal* 21(17) 4411–4419

Zhu J; Wang K Z Q; & Chu C T, 2013, “After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival” *Landes Bioscience* 9(11) 1663–1676