

UCH-FC  
DOC-BMCN  
T 649  
C. 1

**“Transporte de proteínas al interior del retículo endoplasmático de células  
COS-7 y su relación con la estructura tubular de este organelo”**

**Tesis**

**Entregada a la**

**Universidad de Chile**

**En Cumplimiento Parcial de los Requisitos**

**Para Optar al Grado de**

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular,  
Celular y Neurociencias**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**Jorge Alejandro Toledo Hernández**

**Noviembre, 2016**

**Directores de Tesis:**

**Dr. Andrés Couve Correa**

**Dr. Christian González Billault**

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Jorge Alejandro Toledo Hernández

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 5 de Octubre del 2016.

Directores de Tesis:

Dr. Andrés Couve Correa .....

Dr. Christian González Billault .....

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Juan Fernández (Presidente).....

Dr. Lorena Norambuena.....

Dr. Ariel Orellana.....

Dr. Miguel Concha.....

"Hay geometría en el zumbido de las  
cuerdas, hay música en la separación de las  
esferas"

Pitágoras

## BIOGRAFIA



Mi trayectoria académica comenzó de trabajando en química medicinal en tres laboratorios durante cuatro años. Luego proseguí mi trabajo como investigador durante tres meses tiempo completo en trabajando en microbiología y biología celular y en a continuación desarrollando mi tesis de bioquímico el área de neurociencia. Durante el doctorado en las diferentes pasantías consolide áreas de biología molecular, y en el transcurso de la tesis enfoque todo mi desarrollo en académico en áreas de microscopia y procesamiento de imágenes, convirtiéndome en experto de estas áreas, combinando experticia en procesamiento de imágenes y microscopia avanzada, desarrollándome en esta área tanto en áreas académicas, como administrativas de los equipos de microscopias, y liderando diferentes colaboraciones del laboratorio en esta área.

Adicionalmente mi desarrollo en investigación ha estado fuertemente ligado a la valoración y comunicación de la ciencia, generando instancias para transmitir a diferentes públicos principios del pensamiento científico, a través de la fundación de la iniciativa MicroMundo, la cual motiva mi desarrollo como científico y permite llevar todas mis capacidades y deseos de investigador a la sociedad.

## DEDICATORIA

Escribir un libro, el mismo libro la misma historia durante un montón de años, al común de la gente podría aburrirle, o desmotivarla, y cuando la historia a veces deja de ser divertida, puede aburrir aún más, sin embargo, algunos terminamos este proceso con ansia de que nunca se acabe y poder contar y escribir muchas historias más. Esta felicidad de ir cada día a un laboratorio a hacer exactamente lo mismo muchos muchos días, ha sido feliz gracias a la gente de este lugar, son muchos así que imaginen que los mencione a todos con mucho cariño, porque de verdad que los quiero y soy feliz discutiendo con ustedes.

Por otra parte, este camino aparte de feliz ha sido lleno de mentores, que han tenido se han esforzado de diferentes maneras para inspirarme su mensaje, aquí debo mencionar, a Andres que reconozco muy bien su esfuerzo en introducir una actitud diferente, y de apoyar mi investigación tanto durante mi tesis como hacia el futuro. Al Maestro Juan Fernandez, que no solo inspiro mis discusiones más exageradas acerca de morfología, sino que también su tiempo en extremo valioso fue utilizado en exceso, leyendo sobre retículos, e historias legendarias de celebridades científicas, y por último Steffen, que por lejos su trato, su apoyo, su manera conducir a un grupo tan raro, me permitieron convertirme en este científico multifacético, pero más que nada me permite ser feliz haciendo todo lo que quiero hacer, por descabellado que sea tengo su apoyo siempre.

MicroMundo tiene un lugar maravilloso en mi vida, esto es ciencia en la vida real y sé que será un cambio positivo en el mundo, y adoro que gente se apasione por lo mismo, así que imaginen que en este momento metafórico estamos chocando nuestros puños en señal de respeto y admiración.

Porque también esta historia tenía días terror, porque los retículos no siempre me quisieron tanto, esos malos días de microscopios, nunca fueron malos incluso el peor de los días fue superado fácilmente, Coraline y Motita tienen la culpa de ayudarme a superar todo lo difícil, todo lo frustrante, e incluso disfrutar todo resultado raro, cada jornada extrema.

Para el final mi Papá mi Mamá, mis hermanas, sobrinito y cuñado, todos ellos, que todo este tiempo cuando pensaban que entendían de lo que hablaba cuando investigaba el cerebro, les cambie el tema a biofísica y me siguen escuchando, y ya casi que se aprenden el nombre de mi tesis. Ellos que están orgullosos de todo, que siempre están presentes, que cuando estoy lejos están siempre conmigo, que cuando tengo cinco minutos para terminar un millón de cosas sufren conmigo y que siempre están... me motivan.

## TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xviii
1.INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Estructura del Reticulo Endoplasmatico (RE) .....	3
1.2. Dinámica estructural del RE .....	5
1.3. Participación del citoesqueleto en los mecanismos convencionales de la dinámica estructural del RE. ....	7
1.4. Mecanismos no convencionales de la dinámica estructural del RE. ....	9
1.5. Cuantificación de la dinámica estructural .....	14
1.6. Estructura del RE y su relevancia en el transporte de proteínas.....	17
1.7. Transporte pasivo y activo de proteínas reticulares .....	17
1.8. Regulación del transporte de proteínas a través del RE .....	19
2.- HIPÓTESIS .....	21
3.- OBJETIVOS .....	21
3.1.- Objetivo General .....	21
3.2.- Objetivos Específicos .....	22
4.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
4.1 Materiales .....	23
4.1.1. Anticuerpos .....	23
4.1.2. Líneas Celulares .....	23
4.1.3. Plasmidios .....	23
4.1.4. Cultivo celular .....	23
4.1.5. Inmunoblot .....	24
4.1.6. Drogas .....	24
4.1.7. Biología molecular .....	24
4.2 Métodos .....	25

4.2.1. Cultivos celulares.....	25
4.2.2. Preparación de los cubreobjetos .....	25
4.2.3. Electroporación de línea celular.....	26
4.2.4. Adquisición de imágenes de microscopía en células.....	26
4.2.5. Experimentos de microFRAP. ....	27
4.2.6. Análisis de imágenes.....	27
4.2.7. Tratamientos con drogas. ....	29
4.2.8. Inmunoblot.....	30
4.2.9. Análisis del metabolismo celular en tiempo real.....	30
5.- RESULTADOS .....	32
5.1. Caracterizar el transporte de proteínas reticulares en células COS-7, implementando una metodología de FRAP en túbulos individuales del RE (microFRAPs).....	32
5.1.1. Monitoreo y optimización del modelo celular para la aplicación de microscopía en células vivas y microFRAPs.....	32
5.1.2. Visualización del RE en células COS-7 mediante microscopía en células vivas.....	34
5.1.3. Estandarización y validación de los métodos en microscopía y biofísica para la obtención del coeficiente de difusión (D).....	36
5.1.4. Caracterización del transporte de KDEL-RFP en RE de células COS-7.	41
5.1.5. Efecto del agotamiento de ATP sobre el transporte de KDEL-RFP a través del RE.....	49
5.2. Caracterizar la dinámica estructural del RE en imágenes de microscopía de células COS-7, mediante la generación de un índice matemático (índice de dinámica, ID).....	51
5.2.1. Generación y validación del índice de dinámica (ID) basado en el análisis de autocorrelación.....	51
5.2.2. Implementación y validación del ID basado en energía de movimiento en el dominio de las frecuencias.....	53
5.2.3. Validación del ID en células vivas.....	56
5.2.4. Validación del ID mediante simulaciones computacionales de la dinámica estructural del RE.....	59
5.2.5. ID del RE en respuesta a modificaciones de la estabilidad de los MTs.	66

5.3. Evaluar la correlación entre ID y micro-FRAPs mediante tratamientos farmacológicos que modifican la dinámica estructural en células COS-7.....	69
5.3.1 Correlación entre modificaciones del ID y el D a través del RE.....	69
6.- DISCUSIÓN .....	71
6.1. Cuantificación del transporte de proteínas por FRAPs en células vivas. .	71
6.2. Cuantificación del transporte al interior del RE mediante microFRAP .....	73
6.3. Diferencias del D en el RE dependientes del tamaño de la región evaluada	73
6.4. Estructura de la célula y su relación con las variaciones en los D obtenidas por microFRAP.....	75
6.5. Dinámica estructural del RE; desafíos en el análisis cuantitativo de la movilidad subcelular: imágenes microscópicas .....	76
6.6. Modificación del ID mediante alteración del citoesqueleto de microtubulos (MTs).....	77
6.7. Bioenergética y su relación con el D. ....	78
6.8. Relación entre la dinámica estructural y el transporte de proteínas; correlación entre ID y D. ....	79
6.9. Relevancia fisiológica en el transporte a grandes distancias. ....	80
7.-CONCLUSIONES .....	82
8. - REFERENCIAS.....	83
9. - ANEXO.....	92
9.1.- Premios.....	92
9.2. - Publicaciones generadas .....	92
9.4.- Actividades de extensión .....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Microdominios estructurales del RE.....	2
Figura 2 Primera descripción en la literatura de la dinámica estructural del RE.....	6
Figura 3. Evaluación de la respuesta al estrés en las condiciones de visualización de células vivas.....	33
Figura 4. Visualización de la dinámica estructural del RE en células COS-7.....	35
Figura 5. Diseño experimental y estandarización del microFRAP.....	37
Figura 6. Desarrollo experimental del micro-FRAP.....	40
Figura 7. Transporte a través del RE evaluado mediante micro-FRAP.....	42
Figura 8. Evaluación del Coeficientes de difusión (D) y fracción móvil de KDEL-RFP en células COS-7 frente a distintas características estructurales de la célula. ....	48
Figura 9. Efecto del agotamiento de ATP en el transporte de una proteína fluorescente en un túbulo único.....	50
Figura 10. Método de cuantificación espaciotemporal de la dinámica estructural del RE a través del tiempo mediante autocorrelación.....	52
Figura 11. Método de la cuantificación espaciotemporal de la dinámica estructural del RE a través del tiempo mediante energía de movimiento.....	55
Figura 12. Evaluación de la eficiencia del ID en células vivas.....	57
Figura 13. Simulaciones de la estructura y la dinámica estructural del RE basadas en la caracterización estructural del RE de células COS-7.....	61
Figura 14. Validación del ID mediante simulaciones computacionales de la dinámica estructural del RE.....	65
Figura 15. Cambios en el ID al alterar progresivamente la estabilización del citoesqueleto.....	68

Figura 16 Coeficiente de difusión posterior a la disminución en la dinámica  
estructural..... 70

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los diferentes mecanismos de generación de la dinámica estructural del RE.....	13
Tabla 2. Metodologías de análisis de la dinámica estructural del RE.....	16

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 1D: Unidimensional
- 2D: Bidimensional
- 2-DG: 2-desoxi-D-glucosa
- 3D: Tridimensional
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- a.n.: Apertura numérica
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARP2/3: Proteína relacionada a actina
- ATL: Atlastina
- ATL2: Atlastina 2
- ATP: Adenosin trifosfato
- BFA: Brefeldina A
- °C: grados Celsius
- Ca<sup>2+</sup>: Ión calcio
- CEPT1: *Choline/ethanolaminephosphotransferase 1*
- CLIMP63: Proteína de membrana de 63 kDa
- CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono
- Ctrl: Control
- D: Coeficiente de difusión efectivo
- DIC: *Differential interference contrast*
- DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO: Dimetil sulfóxido

Drp1: *Dynamamin-related protein 1*

DTT: Ditioneitol

EB1: *End-binding protein 1*

EB3: *End-binding protein 3*

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

EGFP: Proteína fluorescente verde aumentada

EYFP: Proteína fluorescente amarilla aumentada

F-actina: Actina filamentosa

FCCP: *Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*

FCS: Espectroscopía de correlación de fluorescencia

FRAP: Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo

GABA: Acido- $\gamma$ -aminobutírico

GABA<sub>B1</sub>: Receptor GABA subunidad B1

GFP: Proteína fluorescente verde

GTP: Guanosín trifosfato

h: horas

HEPES: Ácido N-(2-Hidroxietyl) piperazina-N'-etanosulfónico.

IDL: Lenguaje de datos interactivo

kDa: Kilodaltons

KDEL: Péptido señal de retención en RE; (lisina, acido aspártico, acido glutámico, leucina)

Lnp1p: Miembro de la familia Lunapark

M: Molar

ME: Microscopía electrónica

Mfn2: Mitofusina-2  
Mg<sup>+2</sup>: Ión magnesio  
MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio  
min.: Minuto  
mL: Mililitro  
mm: Milímetro  
mM: Milimolar  
mRFP: RFP monomérica  
ms: Milisegundos  
MTs: Microtúbulos  
Myo4p: Proteínas miosina 4  
mW: Miliwatts  
MW: Peso molecular  
NaCl: Cloruro de sodio  
NH<sub>4</sub>Cl: Cloruro de amonio  
nm: Nanómetros  
NMDA-R: Receptor de N-metil-D-aspartato  
Noco: Nocodazol  
n.s.: No significativo  
p22: proteína de unión a calcio  
p180: Proteína de 180 kilodaltons  
PBS: Buffer fosfato salino  
PIS: Fosfatidil inositol sintasa  
PFA: Paraformaldehído

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Ptc1p: Serina/treonina Fosfatasa

RE: Retículo endoplásmico

REL: Retículo endoplásmico liso

RER: Retículo endoplásmico rugoso

REEP1: *Receptor expression-enhancing protein 1*

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación

RFP: Proteína fluorescente roja

R-FRAP: Región donde se realiza el microFRAP

Rab10 *Ras-Related GTP-Binding Protein 10*

ROI: Región de interés

ROT/AA: Rotenona y Antimicina

s: Segundos.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SOCE: *Store-operated calcium entry*

STIM: *Stromal Interaction Molecule*

STIM1: *Stromal Interaction Molecule 1*

TAC: Complejo de adjunte a la punta de los microtúbulos

Thaps: Tapsigargina

TEMED: N,N,N,N -Tetrametil-Etilenediamina

U.A.: Unidades arbitrarias

µg: Microgramo

µl: Microlitro

$\mu\text{m}$ : Micrómetro

$\mu\text{M}$ : Micromolar

$\mu^2/\text{s}$ : Micrómetro cuadrados por segundo

V: Voltaje

VAMPB: Proteína de membrana asociada a vesícula B

Xbp1: X-box binding protein 1,

## RESUMEN

El retículo endoplasmático (RE) es un organelo membranoso presente en todos los eucariontes. Su estructura, altamente compleja, consiste en una red continua de túbulos y cisternas, que se reorganizan continuamente en términos de tamaño, interconectividad y disposición, lo que denominaremos dinámica estructural del RE. La dinámica estructural del RE depende principalmente del citoesqueleto de microtúbulos (MTs) y proteínas asociadas a este último.

Aunque está bien establecido que los procesos biofísicos pasivos de difusión simple contribuyen de manera significativa al transporte de proteínas a través del RE, se desconoce si existen componentes adicionales que podrían suministrar una fuerza motriz, como la dinámica estructural del RE. Las aproximaciones actuales para medir el transporte en las células se basan en métodos de perturbación, como la recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP). Estos métodos son útiles para evaluar el transporte de las poblaciones de proteínas, sin embargo, sólo se pueden aplicar a nivel global, obteniendo un coeficiente de difusión ( $D$ ) sin consideraciones de los cambios en la estructura en la cual se evalúa. Además, son poco efectivos para detectar múltiples  $D$  en un mismo compartimento celular. Evidencia acumulada permite suponer que la variedad de movimientos subcelulares es mucho más extensa de lo que ha podido ser descrito hasta el momento, principalmente por falta de herramientas metodológicas.

En esta tesis se desarrolló un método basado en microscopía óptica para cuantificar el transporte de proteínas en micro-regiones del RE llamado microFRAPs, en células COS-7 marcadas con KDEL-mRFP (una sonda

fluorescente específica para el RE), mediante microscopía confocal de disco rotatorio y análisis de imágenes. Se cuantificó el transporte de proteínas por microFRAP de dominios individuales del RE obteniendo D y la fracción móvil en un túbulo individual. Las estimaciones de D sugieren que la difusión de proteínas lumenales en microdominios es más lenta que en regiones de mayor tamaño. Estos resultados revelan un componente adicional a la difusión pasiva descrita anteriormente.

Por otra parte, se formuló un nuevo descriptor matemático-computacional para cuantificar la dinámica estructural del RE con una alta resolución temporal, llamado índice de dinámica (ID), usando análisis de autocorrelación y la estimación de la energía de movimiento. Además, se generó un *gold-standard* para evaluar el rendimiento de ID bajo condiciones simuladas y en células vivas, permitiendo cuantificar la dinámica de una red cerrada con un único índice matemático: el ID, algo que no está descrito en la literatura.

Finalmente aplicamos la metodología para evaluar simultáneamente cambios en ID y D en condiciones control y bajo modificación de la dinámica estructural del RE con drogas que modifican la estabilidad del citoesqueleto. Observamos una disminución en el D correlativa a una caída del ID producto del tratamiento farmacológico.

Nuestros resultados contribuyen a generar herramientas matemáticas para cuantificar la dinámica del RE y el transporte de proteínas para una comprensión de su importancia en la fisiología celular. Específicamente, los parámetros ID y D proporcionan una combinación única para correlacionar a nivel local y global el

transporte de proteínas y dinámica estructural del RE, estableciendo una nueva metodología para evaluar la relación entre estas propiedades del organelo.

## ABSTRACT

The endoplasmic reticulum (ER) is a membranous organelle present in all eukaryotic cells. It is organized as a single, spatially continuous and geometrically complex network of tubules and cisternae that undergoes major structural changes during time, regarding size, interconnectedness and disposition, in a phenomenon that we will call ER structural dynamics. This ER structural dynamics depends mainly on the microtubule (MT) cytoskeleton and its associated proteins.

Although it is well established that biophysical processes of simple passive diffusion contribute significantly to protein transport, it remains unknown whether there is an influence of other components such as, ER structural dynamics. Current approaches for measuring intracellular transport are based on perturbation methods such as fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). These approaches are useful to evaluate the transport of protein populations; however, they can only be applied at global level, in order to compute a diffusion coefficient ( $D$ ) that does not account for changes in the structure from where it is computed. Moreover, they are ineffective for detecting multiple  $D$ s within the same cellular compartment. Accumulated evidence suggests that the variety of subcellular movements is much more extensive than described so far, mainly due to the lack of methodological tools.

In this thesis we developed a method based on optical microscopy to quantify protein transport in micro-regions of the ER called microFRAPs, applied to COS-7 cells transfected with mRFP-KDEL (ER-specific fluorescent probes), and using spinning-disk confocal microscopy and image analysis techniques. We measured protein transport by microFRAP in individual domains, obtaining values for  $D$  and the

mobile fraction for a single ER tubule. We compared changes in the measured  $D$  after modifying the dynamics of the ER network. Our measurements indicate that the diffusion of luminal proteins in micro-regions is slower when compared to typical FRAP measurements for larger regions. Our findings suggest a component additional to the passive diffusion previously described.

We also formulated a novel mathematical-computational descriptor to evaluate the ER structural dynamics, called the dynamic index (DI), based on autocorrelation analysis and motion energy estimations. In addition, we produced a gold standard in order to evaluate its performance for simulated conditions and living cells. This allowed us to quantify the dynamics of a closed network with a single numerical index, the DI, which has not been previously described.

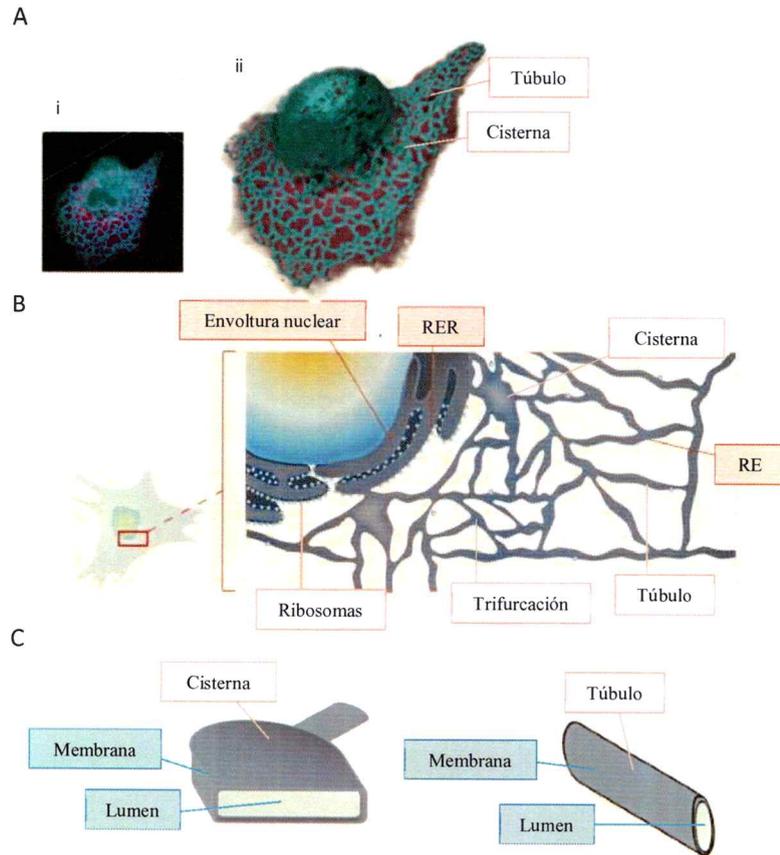
Finally, we applied our methodology to assess changes in  $D$  and DI, under (i) control conditions, and (ii) modified ER structural dynamics by pharmacological treatments that alter the cytoskeleton stability. We observed a correlated decrease in the  $D$  and DI values, caused by the drug treatment.

Our findings contribute to generate a mathematical toolbox to quantify the ER structural dynamics and protein transport, in order to locally and globally correlate protein transport and ER structural dynamics, hence setting a new methodology to evaluate the relationship between them.

## 1. INTRODUCCIÓN

El retículo endoplasmático (RE) es un organelo multifuncional que participa en procesos esenciales para la fisiología celular tales como el movimiento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , síntesis de lípidos, homeostasis de glucosa, y regulación de los niveles de ácido araquidónico. Constituye el primer compartimento en la ruta secretora, realizando la síntesis, modificación, ensamblaje y transporte de la mayoría de las proteínas secretadas, las destinadas a la membrana celular y las que residen en los compartimentos de las vías endocíticas (Friedman and Voeltz, 2011; Nikonov and Kreibich, 2003; Park and Blackstone, 2010; Westrate et al., 2015).

Tradicionalmente el RE se ha estudiado mediante microscopía electrónica (Palade and Porter, 1954) clasificándolo en tres regiones: (i) el RE rugoso (RER), que se caracteriza por poseer un gran número de ribosomas adheridos a su membrana, lo que le permite cumplir su función en la síntesis de proteínas; (ii) el RE liso (REL), cuya función se relaciona con el transporte de proteínas, la síntesis de lípidos, la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y el establecimiento de contactos con otros organelos (Baumann and Walz, 2001); y (iii) la envoltura nuclear que actúa como barrera física separando los cromosomas del citoplasma (Lu et al., 2011). Tanto en el REL como en el RER se identifican túbulos, trifurcaciones y cisternas los que se denominara en su conjunto como microdominios estructurales (Figura 1).



**Figura 1 Microdominios estructurales del RE.**

(A) Reconstrucción tridimensional de una célula COS-7, transfectadas con la proteína KDEL-RFP, un marcador fluorescente de RE (pseudocoloreada en verde) y mNeonGreen soluble, para el citoplasma (pseudocoloreado en rosado). Se aprecian sus diferentes microdominios estructurales, cisternas y túbulos. (i) Reconstrucción tridimensional de la serie de imágenes fluorescente. (ii) Representación tridimensional del volumen generada mediante variaciones de la opacidad el contraste y el brillo. (B) Ilustración esquemática de la estructura de la RE en una típica célula no polarizada (morado), se distinguen tres regiones: la envoltura nuclear; el RE rugoso (RER), que es rico en ribosomas (azul claro); y el RE liso (REL) formando una red tubular que contiene menos polirribosomas. Ilustración original Couve-Lab, adaptada de (Gonzalez and Couve, 2014). (C) Ilustración esquemática de microdominios del RE donde se aprecia como la membrana (gris), forma una cavidad interior acuosa denominada lumen (celestes).

## 1.1. Estructura del RE

El RE es una estructura membranosa, que envuelve una cavidad interior acuosa denominada lumen, la cual ha sido caracterizada en diferentes microdominios interconectados; sacos aplanados denominados "cisternas", y túbulos interconectados entre sí denominados "trifurcaciones" (Figura 1), siendo presencia de estos microdominios es altamente conservada en los eucariontes, desde células vegetales hasta neuronas (Palade and Porter, 1954; Porter et al., 1945; West et al., 2011a).

Los túbulos poseen un diámetro característico entre 40 a 100 nm, el cual es generado mediante la acción de diversas proteínas de la familia de reticulones y DP1/REEP/Yop1 que poseen la propiedad de incrustarse como cuñas en el lado externo de la membrana del RE, induciendo la curvatura observada en los túbulos (Shibata et al., 2008; Voeltz et al., 2006). Estas proteínas inducen incluso la formación de túbulos a partir de proteoliposomas (Shibata et al., 2008), y promueven el aumento de la proporción de túbulos en relación a la cantidad de cisternas (Hu et al., 2009; Voeltz et al., 2006).

Las cisternas tienen una estructura de sacos aplanados con diferentes extensiones, pero con una distancia característica y constante. En estas se han descrito una serie de proteínas responsables de esta estructura, destacando la proteína de transmembrana de 63 kDa CLIMP63. Esta proteína se encuentra ubicada en ambas caras de la cisterna y la interacción homotípica de sus segmentos lumbinales funciona como un preciso espaciador (Klopfenstein et al., 2001; Schweizer et al., 1995). De manera complementaria, las proteínas de la familia de

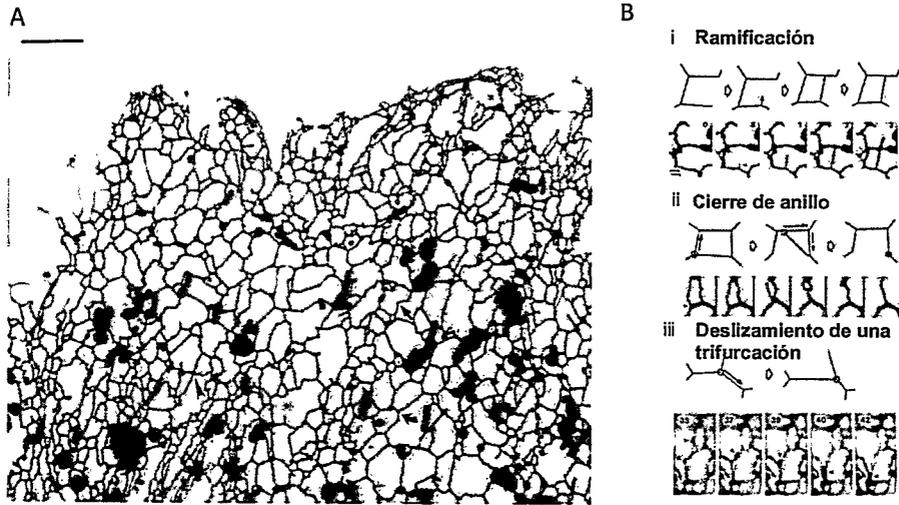
los reticulones se ubican en la periferia de la cisterna, consiguiendo que la membrana logre grados de curvatura imposibles para una bicapa lipídica por sí misma (Voeltz et al., 2006). Adicionalmente se ha observado que las cisternas son capaces de asociarse entre sí, mediante la adhesión de sus proteínas de membrana por apilamientos ordenados del RE (Snapp et al., 2003b), demostrándose también que estos apilamientos de membrana adoptan un orden tipo “estacionamiento de autos”, en el que diferentes niveles se conectan a través de rampas helicoidales, en una configuración que maximiza la eficiencia en el transporte (Terasaki et al., 2013).

Por otra parte, el estudio en células vivas mediante la combinación de microscopía DIC y de fluorescencia ha permitido visualizar como estos microdominios del RE se encuentran en constante reordenamiento, y deformación (Dabora and Sheetz, 1988; Hu et al., 2009; Lee and Chen, 1988; Orso et al., 2009; Pendin et al., 2011; Prinz et al., 2000; Terasaki, 1990; Terasaki et al., 1986; Terasaki et al., 2013; Voeltz et al., 2006). Este conjunto de cambios será denominado en lo sucesivo dinámica estructural del RE.

## 1.2. Dinámica estructural del RE.

Los mecanismos celulares y moleculares que generan y mantienen la compleja estructura del RE han sido ampliamente estudiados. La primera descripción de la dinámica estructural del RE fue realizada por Lee y colaboradores en 1988 (Lee and Cheen, 1988), indicando por una parte la inexistencia de eventos de fisión en el RE y por otra parte describiendo detalladamente diferentes eventos dinámicos: extensión de túbulos, cierre de anillos poligonales, y desplazamiento de trifurcaciones del RE (Figura 2). También se mencionan otra clase de eventos como vibraciones e inmovilización de microdominios.

En cuanto a la generación de la geometría poligonal del RE, se ha descrito que una fracción purificada de membranas de RE en conjunto con ATP y GTP en presencia de la GTPasa Atlastina, son suficientes para la reconstitución *in vitro* de las trifurcaciones y por consiguiente de la red (Dreier and Rapoport, 2000; Orso et al., 2009), demostrando que no se requieren proteínas del citoesqueleto para la generación de la red. Este hallazgo ha tomado gran relevancia debido a la asociación directa de mutaciones de la GTPasa Atlastina con un conjunto de patologías motoras denominadas paraparesias espásticas hereditarias (Park et al., 2010). A pesar de esta evidencia el citoesqueleto es fundamental en el mantenimiento de la estructura del RE *in vivo*, y en casi la totalidad de los mecanismos de su dinámica estructural (Tabla 1, columna 8; relevancia del citoesqueleto).



**Figura 2 Primera descripción en la literatura de la dinámica estructural del RE.**

Figura modificada desde Lee and Chen 1998. (A) Células CV-1 tratada con con DiC<sub>6</sub>(3) marcador de organelos membranosos, utilizado para visualizar el RE. Barra de escala 5.5 µm. (B) Mediante el seguimiento de la misma célula en diferentes tiempos se demostró la existencia de eventos dinámicos: (i) ramificación de túbulos; (ii) colapso de anillo; y (iii) deslizamiento de trifurcaciones. Panel superior indica un dibujo representativo de cada movimiento tomado desde el artículo original. Barra de escala 1 µm.

### **1.3. Participación del citoesqueleto en los mecanismos convencionales de la dinámica estructural del RE.**

El citoesqueleto es el principal generador de la dinámica celular, controlando procesos tales como el tráfico de membranas, el posicionamiento de los organelos, el transporte intracelular, la división y el establecimiento de la polaridad celular (Fletcher and Mullins, 2010). Estructuralmente el citoesqueleto es un entramado tridimensional compuesto de microfilamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos (MTs). El citoesqueleto de MTs está íntimamente relacionado con el RE, evidenciándose co-distribución de sus componentes en extensas zonas, motivo por el cual se ha estudiado intensamente su papel en la dinámica estructural del RE (Allan, 1995; Dabora and Sheetz, 1988; Terasaki et al., 1986; Waterman-Storer et al., 1995; Waterman-Storer and Salmon, 1998).

Los MTs son polímeros polarizados de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina que son regulados por modificaciones post-traduccionales y por proteínas asociadas que influyen tanto en la estabilidad del polímero, como en la asociación de este a motores moleculares (Nogales, 2000). CLIMP63, además de participar en la generación de cisternas, ha sido la primera proteína descrita en la relación RE-MTs. Esta proteína se encuentra inserta en la membrana del RE y se une directamente a MTs promoviendo la elongación de los túbulos del RE hacia la periferia de la célula (Klopfenstein et al., 1998; Shibata et al., 2010). Adicionalmente, un gran número de proteínas que asocian de manera estable MTs al RE han sido descritas, entre ellas huntingtina, P22 (proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ ), VAMPB (proteína asociada a membranas de vesículas), y quinectina (Vedrenne and Hauri, 2006).

Los movimientos del RE basados en MTs han sido implicados en la expansión y reorganización de la red tubular del RE (Friedman et al., 2010a; Hoth and Penner, 1992; Soboloff et al., 2012; Waterman-Storer et al., 1995; Waterman-Storer and Salmon, 1998; Wozniak et al., 2009) aceptándose hasta el momento que son el componente más relevante de la dinámica estructural del RE en células animales (Tabla 1).

Dos mecanismos asociados al citoesqueleto de MTs regulan la extensión de túbulos del RE, diferenciándose principalmente por su velocidad, frecuencia, y mecanismos moleculares involucrados: (i) deslizamiento, que corresponde a la rápida extensión de un túbulo del RE mediante su asociación a un motor molecular del tipo dineína o quinesina que lo transporta a lo largo de un MT preexistente, preferentemente estabilizado por modificaciones post-traduccionales como acetilaciones (Friedman et al., 2010a; Waterman-Storer et al., 1995; Waterman-Storer and Salmon, 1998; Wozniak et al., 2009); (ii) TAC (por sus siglas en inglés *Tip Attachment Complex*), que corresponde a la asociación de un túbulo del RE al extremo en crecimiento del MT, asociándose y extendiéndose en conjunto (Friedman et al., 2010a; Waterman-Storer et al., 1995; Waterman-Storer and Salmon, 1998; Wozniak et al., 2009). El movimiento tipo TAC es esencial para la abastecimiento de  $Ca^{2+}$  luminal desde la zona extracelular hacia el interior del RE en un proceso llamado almacenamiento operado por la entrada de  $Ca^{2+}$  (*store-operated calcium entry*, SOCE) (Hoth and Penner, 1992; Soboloff et al., 2012).

Ambos movimientos, deslizamiento y TAC, son los principales eventos de dinámica estructural reportados en la literatura, observando su presencia en numerosos modelos y su relevancia en procesos fisiológicos relacionados al RE.

Por este motivo serán denominados mecanismos convencionales de la dinámica estructural del RE, que se detallan en la Tabla 1.

#### **1.4. Mecanismos no convencionales de la dinámica estructural del RE.**

Como se indica arriba, los mecanismos convencionales de la dinámica estructural del RE han sido ampliamente abordados en la literatura (Westrate et al., 2015). Sin embargo, las descripciones clásicas hacen alusión mayoritariamente solo a un número muy particular de eventos como deslizamiento de túbulos y cierre de anillos poligonales, siendo excluido un gran número de eventos fácilmente observables en diferentes modelos, como deslizamiento de una trifurcación, retracción, oscilaciones, los cuales han sido mencionados en la literatura, pero sobre los cuales se desconoce su relevancia. Estos eventos serán referenciados como mecanismos no convencionales (Tabla 1).

A pesar de que convencionalmente la dinámica estructural ha sido asociada principalmente a MTs en células animales, se ha demostrado en menor medida su relación con microfilamentos, observándose que la retracción de túbulos hacia el centro de la célula es perturbado cuando se afecta el ensamblaje de los microfilamentos o los motores de actina (Terasaki and Reese, 1994; Waterman-Storer and Salmon, 1998; Wozniak et al., 2009). También el RE sufre un movimiento pasivo debido a flujos del citoplasma los que han sido descritos ampliamente en células vegetales (Goldstein et al., 2008; Verchoř-Lubicz and Goldstein, 2010) y animales (Ajduk et al., 2011; Bradke and Dotti, 1997), vinculando su origen

principalmente a la contracción de redes de actina (Ajduk et al., 2011; Niwayama et al., 2011; Serbus et al., 2005). Sin embargo, la relevancia fisiológica de estos cambios es todavía confusa pues no induce cambios evidentes en la morfología del RE en estas células.

Por otra parte, existe evidencia que le resta relevancia a la relación entre MTs y RE. En particular: (i) el alineamiento del RE y los MTs no ocurre a través de toda la estructura del RE (Shibata et al., 2006; Terasaki et al., 1986); (ii) los MTs o microfilamentos no son necesarios para la generación de la estructura tubular del RE *in vitro* (Dreier and Rapoport, 2000); (iii) la retracción hacia el centro de la célula es un proceso independiente de MTs (Terasaki and Reese, 1994); y (iv) el RE no colapsa completamente luego de la despolimerización de componentes del citoesqueleto (Shibata et al., 2006; Terasaki et al., 1986). Esta complejidad en la relación existente entre el citoesqueleto y la dinámica estructural del RE sugiere la existencia de mecanismos adicionales, los cuales han sido pobremente descritos.

Tipo de movimiento	Modelo experimental	Proteínas relacionadas	Mecanismo	Relevancia fisiológica	Parámetros biofísicos	Métodos	Relevancia citoesquelética	Referencias
<b>Mecanismos convencionales de dinámica estructural del RE</b>								
Deslizamiento.	Células de pulmón de salamandra, COS-7.	Quinesina, Dineína, Miosina, Tubulina acetilada.	Deslizamiento del RE ocurren preferentemente en MTs acetilados.	Establecimiento y mantenimiento de contactos con las mitocondrias, (hipótesis no demostrada).	0.49 $\mu\text{m/s}$	Microscopía de células vivas	Muy importante	(Friedman et al., 2010a; Lee and Chen, 1988; Tanaka et al., 1998; Waterman-Storer and Salmon, 1998; Wozniak et al., 2009; Wright et al., 1993)
Complejo de adhesión al extremo del MT (TAG).	Células de pulmón de salamandra, HeLa.	EB3, EB3, STIM1.	El agotamiento del $\text{Ca}^{2+}$ RE induce unión de STIM (RE) a la punta de un MTs en crecimiento.	Homeostasis de $\text{Ca}^{2+}$ , redistribución del RE en mitosis.	0.07 $\mu\text{m/s}$ 0.044 $\mu\text{m/s}$	Microscopía de células vivas	Muy importante	(Friedman et al., 2010a; Grigoriev et al., 2008; Lee and Chen, 1988; Waterman-Storer and Salmon, 1998)
Deslizamiento local.	Neuronas ganglio cervical superior.	Miosina Va.	Miosina Va media movimientos de corto alcance sobre microfilamentos corticales	Movimiento local en regiones que carecen de microtúbulos como las terminales presinápticas.	0.07 $\mu\text{m/s}$	Inmuno ME. Microscopía de células vivas.	Muy importante	(Bridgman, 1999; Dekker-Ohno et al., 1996; Takagishi et al., 1996)
Colapso de anillo poligonal.	Células COS-7, levaduras.	Drp1, Mfn2.	Mitocondria estrangulada por el cierre de un anillo poligonal	Marca los sitios de división mitocondrial.		ME y tomografía.	Relevancia desconocida	(Friedman et al., 2011; Lee and Chen, 1988)
Formación de una trifurcación	Células COS-7 S. cerevisiae.	ATL2/Sey1p.  Rab10, CEPT1, PIS.	Fusión homotípica de membranas dependiente de hidrolisis de GTP  Rab10/CEPT1/PIS se posicionan en el extremo de un túbulo en crecimiento	Generación de geometría de red  Plataformas para la síntesis y el transporte de fosfolípidos intra o inter-organelos, (hipótesis no demostrada).		RE in vitro.	Relevancia desconocida	(Chen et al., 2012; Hu et al., 2009)
					0.2 eventos/área ( $\mu\text{m}^2$ ) en 5 min.	Microscopía de células vivas.	Muy importante	(English and Voeltz, 2013b)

Tipo de movimiento	Modelo experimental	Proteínas relacionadas	Mecanismo	Relevancia fisiológica	Parámetros biofísicos	Métodos	Relevancia citoesquelética	Referencias
<b>Mecanismos NO convencionales de dinámica estructural del RE</b>								
Partículas de RE.	Neuronas hipocampales.	Quinesina-1.	Transporte dirigido de partículas a través del RE, (evidencia preliminar).	Almacenamiento de Ca <sup>2+</sup> , (hipótesis no demostrada).	~ 0.2-0.3 µm/s.	Microscopía de células vivas.	Muy importante	(Bammi et al., 2004; Herman, 2008)
Deslizamiento de una trifurcación.	Axón gigante de calamar.	Miosina V.	Desconocido	Señales de Ca <sup>2+</sup> , exocitosis terminal presináptica, (hipótesis no demostrada).	1.0 µm/s	Microscopía de células vivas.		(Langford, 1999; Tabb et al., 1998)
Deformación de la membrana del RE	Células CV-1	Desconocido	Desconocido	Transporte vesicular, (hipótesis no demostrada).			Relevancia desconocida	(Lee and Chen, 1988)
Transformación de cisternas	Células epidermales de tabaco.	CLIMP63	Desconocido	Sitios de anclaje/crecimiento		Inmuno-fluorescencia	Muy importante	(Klopfenstein et al., 1998)
Transformación de cisternas	Fibroblastos 3T3	F-actina, ARP2/3, α-actinina, F-actina	Propiedades viscoelásticas del citoplasma, (hipótesis no demostrada).	Cambio en las propiedades mecánicas de la célula, (evidencia preliminar).		Microscopía de molécula única	Relevancia desconocida	(Tseng et al., 2002; Wirtz, 2009)
Transformación de cisternas	Levaduras.	Lnp1p, Sey1p		Remodelamiento de la membrana, (hipótesis no demostrada).			Relevancia desconocida	(Chen et al., 2012)
Persistencia de cisternas	Células Huh-7, Células HeLa	Actina, Miosina 1C	Miosina 1C guía la formación de actina filamentososa en la vecindad del RE formando una barrera física pasiva restringiendo la red	Mantenimiento del balance túbulo cisterna. Regulación eventos de remodelamiento de cisternas	0.15 ± 0.23 µm/s	Microscopía de células vivas, ME	Muy importante	(Joensuu et al., 2014)
Fisión.	Cultivos y rebanadas de neuronas hipocampales.	NMDA-R, glutamato.	Rápida fragmentación inducida después de isquemia, reversible fusión restable la continuidad.	Respuesta protectora contra el estrés isquémico severo.	1 a 2 min.	Microscopía de multifotón, FRAP	Independiente	(Kucharz et al., 2011a; Kucharz et al., 2011b)
Empaquetado de la envoltura nuclear.	Células RBL, células 3T3.	Ribonucleoproteínas.	Ca <sup>2+</sup> induce fragmentación reversible	Transporte fuera del núcleo de ribonucleoproteínas excepcionalmente grandes.		Microscopía confocal, FRAP	Relevancia desconocida	(Subramanian and Meyer, 1997)
Envoltura nuclear en división celular.	S. cantonesa	Reticulón 4A	Ruta exportación a través de la envoltura nuclear independiente del complejo del poro	Entrega exitosa del RE a las células hijas y formación de la red tubular.		Microscopía de células vivas	Independiente	(Anderson and Hetzer, 2008; Dawson et al., 2009; Kiseleva et al., 2007)

interacción estable	S. cerevisiae.	Miosina V, Myo4p, Ptc1p.			Muy importante	(Fehrenbacher et al., 2002)
	Huevos de erizo	Dineína.			Muy importante	(FitzHarris et al., 2007; Terasaki, 2000)
		REEP1, p180, p22, CLIMP63.	Asociación de RE a cisternas del RE	Restringir movilidad lateral de las membranas	Ensayos de interacción de proteínas	(Andrade et al., 2004; Klopffenstein et al., 1998; Ogawa-Goto et al., 2007; Park et al., 2010)

**Tabla 1. Resumen de los diferentes mecanismos de generación de la dinámica estructural del RE.**

Categorización de diferentes clases de movimientos que han sido descritos en el RE de diferentes modelos experimentales, y algunas de sus características fundamentales para comprenderlos, destacando la relevancia del citoesqueleto en la generación de cada uno de ellos. Para su mejor comprensión estos fueron clasificados en dos categorías en base a los siguientes criterios: 1.- Mecanismos convencionales: movimientos citados frecuentemente en la literatura como los únicos responsables de la dinámica estructural (tabla superior). 2.- Mecanismos no convencionales: movimientos de RE referenciados en menor medida y no considerados en las descripciones clásicas de la dinámica estructural del RE (tabla inferior). Símbolos y abreviaciones: R-NMDA, receptor de n-metil-D-aspartato; ME, microscopía electrónica; EN, envoltura nuclear; min., minutos; s, segundos.

## 1.5. Cuantificación de la dinámica estructural

La descripción de la dinámica estructural del RE se ha abordado de múltiples maneras cualitativas, identificando una amplia diversidad de movimientos. No obstante, el desarrollo de herramientas para su análisis cuantitativo a través de análisis de imágenes de microscopía óptica aún se encuentra en progreso. La principal dificultad de los métodos cuantitativos es la estructura del RE, la cual puede modelarse como una red no orientada (grafo no direccionado) en la que eventos de diferente magnitud y frecuencia ocurren en múltiples regiones. En este contexto una herramienta ideal de cuantificación de la dinámica estructural del RE tendría como objetivos: identificar y localizar el evento dinámico, medir su velocidad, frecuencia, orientación e idealmente las fuerzas involucradas.

Las herramientas actuales se han focalizado principalmente en describir parámetros estructurales como la longitud de los túbulos (Puhka et al., 2012a; Puhka et al., 2007a; West et al., 2011b), su diámetro (West et al., 2011b), y los grados de ramificación (Puhka et al., 2012a; Puhka et al., 2007a), presentando grandes complicaciones al ser aplicadas sobre series temporales. Por otra parte, nuevas metodologías en óptica y procesamiento de imágenes han puesto su interés en la descripción cuantitativa sin necesariamente identificar el tipo de proceso dinámico subyacente; algunas de estas son resumidas en la Tabla 2.

Adicionalmente, restricciones experimentales dificultan la implementación de estas metodologías entre ellas: (i) los ejemplares tienen distinta cantidad de túbulos y cisternas, e incluso entre modelos muy similares se observan grandes variaciones en la frecuencia y velocidad de movimiento (Wozniak et al., 2009); (ii) las respuestas

de células vivas son demasiado complejas dificultando la interpretación de los resultados, por ejemplo, la alteración del citoesqueleto la dinámica estructural del RE, modificando además la relación túbulo/cisternas en la célula completa, junto con muchos otros procesos subcelulares (Costantini and Snapp, 2013).

Estas restricciones han motivado el desarrollo de innovadoras herramientas de microscopía y procesamiento de imágenes, resumidas en la Tabla 2, las que aún son insuficientes para describir los mecanismos convencionales de la dinámica estructural del RE, y no consideran todos los demás eventos de dinámica estructural no convencional. Por lo tanto, es, necesario el desarrollo de nuevas herramientas cuantitativas para identificar y clasificar eventos de dinámica estructural avanzando en el entendimiento de su relevancia fisiológica.

Técnicas de estimulación microscópica
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Microscopía de fase dinámica:</b> (Vyshenskaya et al., 2014)</li> <li>• <b>Microreología:</b> (Weihs et al., 2006)</li> <li>• <b>Pinzas ópticas:</b> (Hawes et al., 2010)</li> <li>• <b>Captura láser de organelos:</b> (Sparkes et al., 2009b)</li> <li>• <b>Estrés de compresión:</b> (Booth-Gauthier et al., 2012)</li> </ul>
Técnicas de procesamiento de imágenes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Persistencia de trifurcaciones:</b> (Lin et al., 2014)</li> <li>• <b>Desplazamiento de trifurcaciones y velocidad promedio:</b> (Bouchekhima et al., 2009)</li> <li>• <b>Análisis de persistencia de centros de masas:</b> (Shemesh et al., 2014)</li> <li>• <b>Esqueletonización:</b> (Bucksch et al 2010, Ma et al 2002, Au et al 2008)</li> <li>• <b>Vectores de desplazamiento por flujo óptico:</b> (Stefano et al., 2014; Ueda et al., 2010)</li> </ul>
Otros modelos que podrían ser adaptados a RE
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Microscopía fluorescente de salpicaduras:</b> (<i>Fluorescent speckle microscopy</i>), (Waterman-Storer et al., 1998)</li> </ul>

**Tabla 2. Metodologías de análisis de la dinámica estructural del RE.**

Resumen de diferentes técnicas ópticas y de procesamiento de imágenes utilizadas en la cuantificación de la dinámica estructural del RE.

## **1.6. Estructura del RE y su relevancia en el transporte de proteínas**

Las proteínas sintetizadas en el RE se posicionan en el lumen (para la secreción) o en su membrana (proteínas de transmembrana), y pueden ser transportadas a través de la red continua de túbulos y cisternas (Baumann and Walz, 2001; Wickner and Schekman, 2005). El transporte de proteínas a través del RE es altamente relevante en los eventos de exportación, las reacciones enzimasustrato, y la formación de dominios especializados de interacción con otros organelos. Parámetros relevantes incluyen la modificación de la velocidad y el tiempo de permanencia de las proteínas en las diferentes regiones y microdominios del RE (Lai et al., 2010; Sandefur and Schnell, 2011; Simon et al., 1992).

## **1.7. Transporte pasivo y activo de proteínas reticulares**

Para evaluar el transporte de proteínas a través del RE se han utilizado preferentemente líneas celulares adherentes como células COS-7, que poseen el RE extendido principalmente en un sólo plano facilitando el rápido registro, y utilizando diferentes aproximaciones experimentales como la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) (Enderlein et al., 2005), el seguimiento de proteínas fotoactivables o fotoconvertibles (Runions et al., 2006) y la recuperación de la fluorescencia luego del fotoblanqueo (FRAP). A partir de estas metodologías se obtienen los coeficientes de difusión (D) utilizados para describir la facilidad con la que se transportan las proteínas (Olveczky and Verkman, 1998).

El transporte de proteínas reticulares puede suceder por medio de dos mecanismos generales: (i) transporte pasivo (difusión), que es la manifestación de la agitación térmica presente en todos los sistemas en equilibrio y es comúnmente referido como movimiento Browniano. La difusión ha sido descrita con la ecuación de Stokes–Einstein, que relaciona un valor de coeficiente de difusión (D) con variables físicas específicas del sistema (Brown 1828; Einstein 1905); y (ii) transporte activo, que se define como el mecanismo mediante el cual las moléculas son transportadas fuera del equilibrio contra o a favor de un gradiente, con un gasto de energía (Lippincott-Schwartz et al., 2001; Miyawaki, 2011).

La difusión simple se puede evaluar gracias a que sigue leyes físicas bien establecidas descritas por la ecuación de Stokes–Einstein. En un sistema donde sólo ocurre difusión simple, D depende de tres variables: temperatura, viscosidad, y radio hidrodinámico.

#### Ecuación de Stokes-Einstein

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

D = Coeficiente de difusión  
 K = Constante de Boltzmann  
 T = Temperatura absoluta  
 η = Viscosidad  
 Rh = Radio hidrodinámico

El aumento en la temperatura genera mayor movimiento browniano (desplazamiento cuadrático medio) y aumento en los valores en D, mientras que incrementos en el tamaño del objeto o en la viscosidad del medio que la rodean disminuirán D. Sin embargo, cuando el transporte pasivo no se ajusta al modelo de difusión simple las diferencias en D pueden interpretarse como el resultado de diversos procesos: colisiones con obstáculos, heterogeneidades en la viscosidad

del medio, e interacciones de asociación-disociación (cambio en el radio hidrodinámico), lo que se entiende por difusión anómala (Garcia-Perez et al., 1999).

Comunmente se presume que el transporte activo posee direccionalidad (e.g. tráfico vesicular), no obstante, si un movimiento no es claramente direccional puede ser pasivo o activo, lo cual no siempre es correctamente interpretado confundiendo fácilmente difusión anómala con transporte activo (Mackintosh, 2012).

### **1.8. Regulación del transporte de proteínas a través del RE**

Como se mencionó arriba, procesos biofísicos pasivos como la difusión simple (Brown 1828; Einstein 1905), contribuyen de manera significativa al transporte de proteínas a través del RE (Dayel et al., 1999), lo que ha sido corroborado en modelos biológicos y en simulaciones computacionales (Olveczky and Verkman, 1998; Sbalzarini et al., 2005). Sin embargo, se presume que la difusión simple es el único mecanismo de transporte al interior del RE (Cui-Wang et al., 2012), a pesar de que procesos adicionales a la difusión han sido propuestos. En *Saccharomyces cerevisiae* se estima que 460 proteínas ingresan por segundo al RE, lo cual podría generar un flujo en su interior (Vincent et al., 2014). De forma coherente, en este mismo modelo se ha observado que es posible obstaculizar la difusión mediante barreras mecánicas (Chao et al., 2014). Finalmente, en células vegetales se ha observado, tanto en RE como en otros organelos tubulares (tilacoides), que el movimiento de proteínas es más rápido de lo predicho únicamente por la difusión simple (Kirchhoff et al., 2011; Kohler et al., 2000; Runions et al., 2006).

En conjunto, la evidencia disponible permite proponer que el transporte de proteínas al interior del RE de células animales es un proceso más complejo que dependería no sólo del transporte pasivo, sino que también podría estar influenciado por otros factores, entre ellos la dinámica estructural de RE.

Para resolver esta pregunta, es necesario superar las limitaciones de las técnicas actuales. Se requiere generar o adaptar métodos que permitan: (I) describir eventos de movilidad subcelular como el transporte de proteínas al interior de microdominios del RE, y (II) Cuantificar la dinámica estructural del RE, (III) Ser capaz de evaluar simultáneamente estos parámetros simultáneamente y así correlacionar el transporte de proteínas del RE y su dinámica estructural y de esta manera aproximarse a su participación en la fisiología celular.

## **2.- HIPÓTESIS**

Un índice de dinámica y microFRAPs permiten cuantificar la dinámica estructural, el transporte de proteínas en microdominios del RE y establecer correlaciones entre ellos.

## **3.- OBJETIVOS**

### **3.1.- Objetivo General**

Establecer metodologías de análisis cuantitativo de la dinámica estructural del RE y del transporte de proteínas a través de túbulos individuales que permitan cuantificar estos eventos de movilidad subcelular y evaluar la correlación existente entre ellos.

### **3.2.- Objetivos Específicos**

**OE1.-** Caracterizar el transporte de proteínas reticulares en células COS-7, implementando una metodología de fotoblanqueo y recuperación (FRAP) en túbulos individuales del RE (micro-FRAPs).

**OE2.-** Caracterizar la dinámica estructural del RE en imágenes de microscopía de células COS-7, mediante la generación de un índice matemático (índice de dinámica, ID).

**OE3.-** Determinar la correlación entre ID y micro-FRAPs mediante tratamientos farmacológicos que modifican la dinámica estructural en células COS-7.

## **4.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1. Anticuerpos**

Anti-GFP (ab6556, Abcam Cambridge, UK), Anti-KDEL de ratón (StressGen, Ann Arbor, MI, USA), Anti-IgG de conejo y ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP, Jackson ImmunoResearch Labs West Grove, PA, USA).

#### **4.1.2. Líneas Celulares**

COS-7 (ATCC N° CRL-1651), Origen: hígado, de *Cercopithecus aethiops* (ATCC, Manassas, VA, USA).

#### **4.1.3. Plasmidios**

pEGFP-N1 (EGFP; Clontech, Mountain View, CA), pDsRed2-ER (ER-RFP; Mountain View, CA), pEYFP-ER (Clontech, Mountain View, CA, USA).

#### **4.1.4. Cultivo celular**

Bicarbonato de sodio (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), Glutamina (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO, USA), Fungizona (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alta glucosa (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), OptiMEM (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), placas para cultivo celular (BD Falcon, San Jose, CA, USA), suero fetal bovino (Biological Industries Ltd. Kibbutz Beit Haemek, Israel), Tripsina/EDTA 10X (GIBCO, Carlsbad, CA, USA).

#### **4.1.5. Inmunoblot**

Acrilamida/Bis-acrilamida (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO, USA), Persulfato de amonio (Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO, USA), Bradford (Bio-Rad, Hércules, CA, USA), Ditiotreitól (DTT; Sigma Chemicals Co St. Louis, MO, USA), líquido revelador y líquido fijador de Kodak (Curitiba, Brasil).

Marcador de peso molecular de proteínas preteñido, rango amplio 19-118 kDa (Winkler, Lampa, Santiago, Chile), membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hércules, CA, USA), metanol técnico (TCL, Santiago, Chile), N,N,N,N -Tetrametil-Etilenediamina (TEMED; Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO, USA), placas fotográficas (Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Londres, Inglaterra), Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Illinois, USA), Tween 20 (Sigma, St. Louis, Missouri, USA).

#### **4.1.6. Drogas**

Ácido 4-(2-hidroxietyl)-piperacín-1-etano-sulfónico (HEPES), Ácido etilenglicol-bis (2 aminoetileter) N,N,N',N' tetraacético (EGTA), Ácido piperacín-1,4-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), Brefeldina A (BFA; Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO, USA), Nocodazol (Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO, USA), Taxol (Sigma Chemicals Co. St. Louis, MO, USA).

#### **4.1.7. Biología molecular**

1 kb DNA Ladder (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), columnas para purificación de ADN plasmidial QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA),

Columnas para purificación de ADN plasmidial QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA).

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1. Cultivos celulares.**

Las células fueron cultivadas utilizando procedimientos estandarizados: medio DMEM alto en glucosa 4500 mg/L, L-glutamina 4 mM, Penicilina/Estreptomina 1% y Fungizona 0.25 µg/mL, 10% de suero fetal de bovino previamente inactivado. Las células fueron mantenidas en una incubadora humidificada, mantenido a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, y cada cuatro meses se recambiaron, en las cuales previamente se demostró estar libres de Mycoplasmas.

### **4.2.2. Preparación de los cubreobjetos**

Para asegurar la adhesión de las células al cubreobjetos y una adecuada extensión de ellas sobre estos, los cubreobjetos fueron tratados con un medio adhesivo *HistoGrip 50X (Life Technologies)* diluido en acetona hasta una concentración de 1X. Los cubreobjetos fueron sumergidos en esta solución 10 veces, seguido de 3 lavados en agua destilada estéril, secado a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad y almacenados a 4°C.

#### **4.2.3. Electroporación de línea celular.**

Las células fueron subcultivadas a una confluencia del 80%, 24 h previas a la electroporación. El día de la electroporación las células fueron lavadas 3 veces PBS y luego incubadas con 1 mL de tripsina 0.25% p/v durante 3 min. a 37 °C hasta formar una suspensión celular. La tripsina fue diluida adicionando 5 ml de PBS 1X, y centrifugándose a 350 x g por 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en 100 µL de *OptiMEM* y mezcladas con 1 µg de ADN plasmidial total (en caso de transfectar 2 plasmidios diferentes se utiliza 0,5 µg de cada uno). Posteriormente las células fueron transfectadas mediante electroporación utilizando el protocolo recomendado por el fabricante para células COS-7 (Gene Pulser Xcell, BioRad). Finalmente, las células fueron transferidas a una placa de 60 mm de diámetro con 4 mL de medio DMEM suplementado con 10 % de FBS e incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Los estudios fueron realizados 20 h posteriores a la transfección.

#### **4.2.4. Adquisición de imágenes de microscopía en células.**

Las células transfectadas fueron transferidas a cubreobjetos de 24 mm de diámetro previamente tratados con HISTOGRIP (*Life Technologies*) y mantenidas en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%. En los experimentos de microscopía de células vivas, el medio de mantención fue reemplazado por *OptiMEM* libre de rojo fenol (*Life Technologies*), 20 min. previos al experimento. En los experimentos de microscopía de una extensión mayor a 15 min., y ante la ausencia de un controlador de humedad ambiental, se evitó la evaporación del medio sellando herméticamente la cámara en la cual se montó el

cubreobjetos. La salud de los cultivos fue controlada en cada experimento mediante inspección visual en el microscopio, observando la integridad de la red mitocondrial en células COS-7 transfectadas con un constructo de mito-GFP. Las imágenes de células vivas fueron adquiridas en un microscopio de disco giratorio (*Perkin Elmer*), mantenido a 37°C, equipado con un objetivo 100x de inmersión en aceite (1.3 a.n.), las imágenes fueron registradas mediante el programa *Velocity 3D Image Analysis*.

#### **4.2.5. Experimentos de microFRAP.**

Se estableció un sistema de fotoblanqueo simultáneo al registro de la fluorescencia, para de esta manera aumentar la resolución temporal. Se utilizó un microscopio confocal de disco rotatorio (*Perkin Elmer*), y láser pulsado de nitrógeno (*Andor micro-pointer*) para el fotoblanqueo, alineado previo a cada sesión experimental, y controlando su correcta alineación con el fotoblanqueo de células COS-7 transfectadas con un constructo de GFP (sin secuencia de destinación, marcando todo el citoplasma) y posteriormente fijadas con PFA durante 10min.

#### **4.2.6. Análisis de imágenes.**

Para el cálculo de los coeficientes de difusión, las imágenes fueron procesadas en la siguiente secuencia: deconvolución, corrección del movimiento, corrección del fotoblanqueo, eliminación de imágenes que no se blanquean lo suficiente, identificación de la región blanqueada y seguimiento de ella a través del tiempo, cuantificación de la intensidad en la región de interés y cálculo del coeficiente de difusión (D), tiempo medio y fracción inmóvil. Para el cálculo del D se utilizó un modelo publicado previamente (Cui-Wang et al., 2012).

La clasificación de la estructura fue realizada aplicando una inspección visual por tres observadores independientes por medio de una serie de 5 parámetros estructurales relativos a la posición de la región donde se realiza el micro-FRAP (R-FRAP) utilizando los siguientes criterios:

- a) Microdominios: Túbulo largo = solo un túbulo en R-FRAP; Túbulo corto = un túbulo y dos trifurcaciones en R-FRAP; Túbulo terminal = túbulo que posee un extremo libre en R-FRAP; Trifurcación = tres túbulos originados de una trifurcación en R-FRAP; Anillo poligonal = tres o más trifurcaciones en un R-FRAP siendo los túbulos de tamaño semejante conformando un polígono
- b) Forma: Alargada = la célula a medida que se extiende en su eje principal, su eje secundario se mantiene constante; Circular = la célula es cóncava en todas las regiones visibles de la imagen; Triangular = a media la célula se extiende en su eje principal, su eje secundario crece proporcionalmente formando una evidente región angulada; Curva = la célula presenta regiones cóncavas y convexas con diferente regularidad.
- c) Tamaño: Pequeña = la célula es contenida completamente en la imagen si fuese posicionada en el centro (las células comunmente no están centradas en el campo visual, ya que se preferencia centralizar el microdominio a analizar); Mediana = la célula es contenida en más de la mitad de su extensión de ser posicionada en el centro de la imagen, además es posible ver parte del núcleo; Grande = la célula ocupa completamente el campo visual y no es posible conocer su tamaño total, o no se detecta el núcleo o los bordes de la membrana celular.
- d) Dinámica de R-FRAP: Nula = la R-FRAP se mantiene inmóvil; Baja = la R-FRAP sufre desplazamientos en una extensión menor a su tamaño (rotación,

translación, o cambios de escala); Alta = la R-FRAP sufre desplazamientos, en una extensión mayor a su tamaño o sufre la transformación de la estructura del microdominio.

- e) Posición relativa: medida desde el centro de R-FRAP hasta el borde de la membrana celular, el borde de la envoltura núcleo, o la sumatoria de ambas medidas.

#### **4.2.7. Tratamientos con drogas.**

Para provocar el agotamiento intracelular de ATP, las células fueron incubadas durante 20 min. a 37°C con medio Tyrode (Opazo et al., 2010), libre de glucosa, y suplementado con 0.1  $\mu$ M de Antimicina A, 1  $\mu$ M de Oligomicina y 10mM de 2-deoxi-D-glucosa. Luego utilizando este mismo medio estas fueron visualizadas en el microscopio por un periodo máximo de 20 min. (Marriott and Mason, 1995).

Para la manipulación farmacológica de la polimerización o depolimerización del citoesqueleto se preparó una serie de drogas a concentraciones previamente publicadas en este modelo celular u otro semejante: Nocodazol a 5  $\mu$ M (Friedman et al., 2010b), Taxol a 10  $\mu$ M (Galan et al., 2011). Todas las soluciones almacenadas a -20°C, descongeladas en el momento de su uso, y diluidas en medio OptiMEM libre de rojo fenol (*Life Technologies*) temperadas a 37°C y aplicadas durante los diferentes tiempos de incubación.

#### **4.2.8. Inmunoblot.**

La extracción de proteínas se realizó con la homogeneización de las células en un tampón que contenía 1M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mg/ml PMSF, 1% Tritón X-100, 20 mM Tris-HCl pH 7,4. La muestra fue sonicada y centrifugada durante 10 min. a 10.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en buffer Laemmli y a continuación fueron desnaturaladas por temperatura. A continuación, las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalantes, y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa corridas a 300 mA durante 1 h, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con una solución que contenía 3% (p/v) de leche descremada y 0,1% de Tween en PBS, pH 7,4 por 1 h. Luego la membrana fue incubada durante la noche a 4°C con los anticuerpos diluidos 1:1000 veces en la misma solución de bloqueo y como control de carga se utilizó anti- $\beta$ -actina (0,3 mg / ml, Sigma). Posteriormente las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (*KPL, Gaithersburg, MD*) diluida 1:6000 en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente, y la reacción fue detectada por ECL (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

#### **4.2.9. Análisis del metabolismo celular en tiempo real.**

Para determinar el efecto de los inhibidores sobre el metabolismo celular, fue utilizado un Extracellular Flux Analyzer 96e (BD Bioscience, USA). 10.000 células COS-7 fueron sembradas por pocillo 24 h previo al experimento en placas de 96 pocillos V7 (BD Bioscience, USA) en medio DMEM alto en glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10%. Fueron mantenidas a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub>. Previo al experimento, el medio fue removido y reemplazado por medio de

ensayo (4 mM glutamina y 10 mM glucosa) sin bicarbonato. Durante 1 h fueron mantenidas a 37°C en una incubadora sin CO<sub>2</sub>.

El consumo de oxígeno fue registrado mediante la aplicación del siguiente protocolo en automatizado de inyección y agitación en el equipo de *Seahorse*: (i): vehículo (*DMSO*), (ii) Oligomicina, (iii) FCCP, (iv) Rotenona y Antimicina-A.

Las primeras mediciones del consumo de oxígeno, previo a las inyecciones, determinó la respiración basal de las células. La inyección de Oligomicina permitió la cuantificación de la fracción de respiración requerida para la síntesis de ATP mitocondrial. Para evaluar el máximo consumo de oxígeno, como reflejo de la máxima transferencia de electrones por la cadena transportadora, el agente desacoplante FCCP previa titulación fue usado en la tercera inyección. Finalmente, para producir la inhibición total de la respiración mitocondrial, fueron agregados inhibidores del complejo I (Rotenona) y complejo III (Antimicina-A).

## **5.- RESULTADOS**

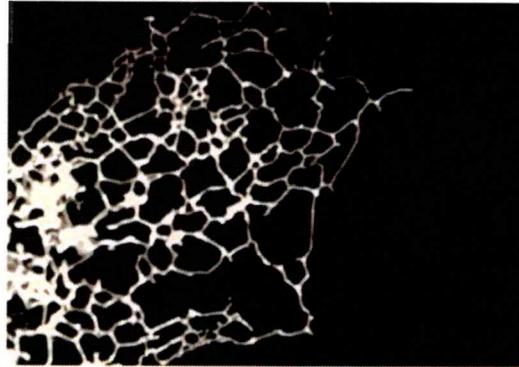
### **5.1. Caracterizar el transporte de proteínas reticulares en células COS-7, implementando una metodología de FRAP en túbulos individuales del RE (micro-FRAPs).**

#### **5.1.1. Monitoreo y optimización del modelo celular para la aplicación de microscopía en células vivas y microFRAPs.**

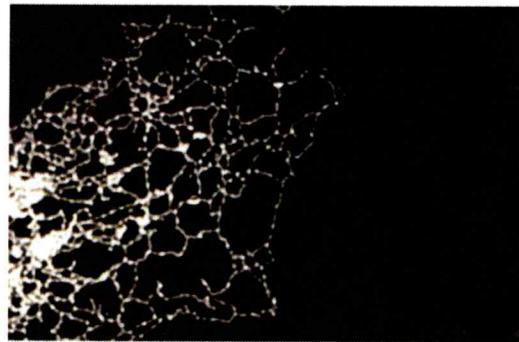
Células de la línea COS-7 son fáciles de mantener y transfectar, y por su forma extremadamente plana han constituido un modelo ideal para estudios de dinámica de organelos (English and Voeltz, 2013a; English and Voeltz, 2013b; Friedman et al., 2010b). Se utilizaron células COS-7 bajo condiciones estandarizadas en esta tesis (detallado en, métodos 4.2.4). Debido a que todas las mediciones se efectuaron mediante la sobreexpresión de la proteína fluorescente roja retenida en RE (KDEL-RFP), se controló la inducción de estrés celular bajo las nuevas condiciones utilizadas en los experimentos de células vivas a través de la fragmentación del RE, la inducción de la chaperona ERP57 y la aparición del fragmento de Xbp1, tres metodologías ampliamente utilizadas para la detección de estrés reticular (Federovitch et al., 2005). Expresiones transitorias de KDEL-RFP menores a 24 h no indujeron fragmentación del RE (Figura 3 A; panel superior), contrario a lo observado en la misma célula luego de la inducción de estrés reticular mediante tratamiento con Thaps. que si produce la fragmentación del RE (Figura 3 A; panel inferior).

A

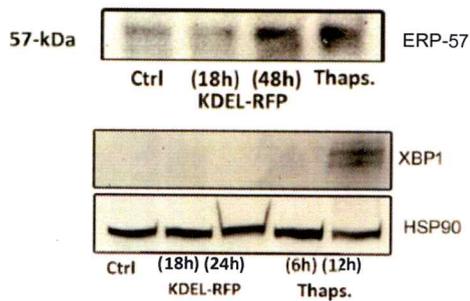
KDEL-RFP



KDEL-RFP Thaps.



B



**Figura 3. Evaluación de la respuesta al estrés en las condiciones de visualización de células vivas.**

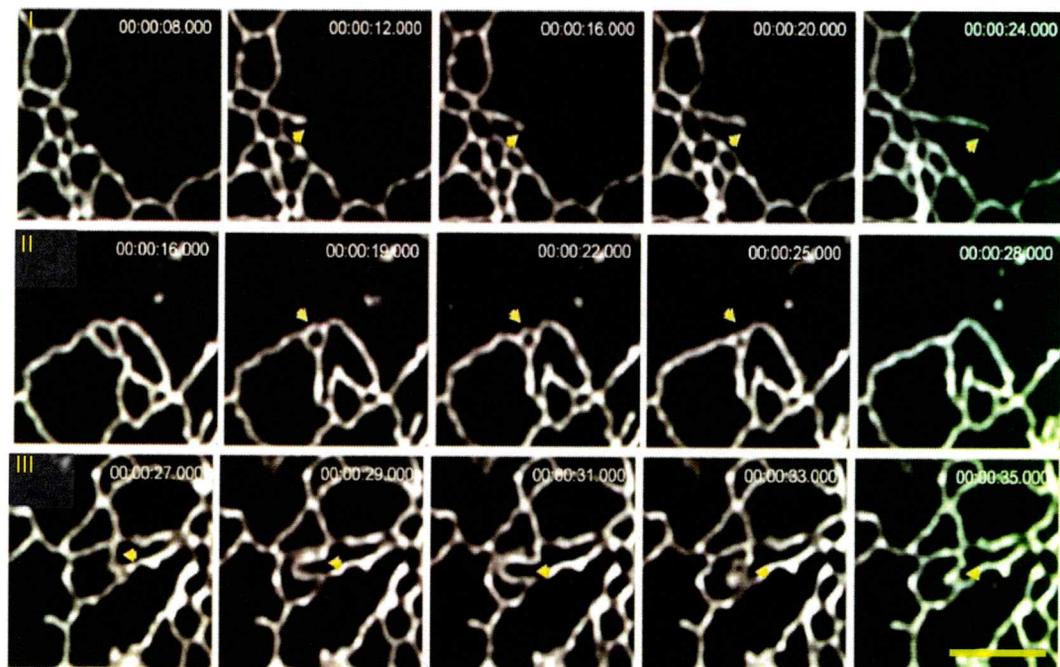
(A) Células COS-7 transfectadas con KDEL-RFP, marcador específico para lumen del RE (pseudocolor blanco). Se visualizó la continuidad del RE bajo condiciones control y luego de la inducción de la fragmentación mediante tratamientos farmacológicos con Thaps. Imagen representativa de 3 experimentos (B) Imagen representativa de un Inmunoblot de lisado de células COS-7 en cuatro condiciones experimentales: sin transfectar (Ctrl); luego de 18h de ser transfectadas con KDEL-RFP (18h); luego de 48h de ser transfectadas con KDEL-RFP (48h); y como control positivo luego de inducir el estrés del RE con tratamiento de 6h con tapsigargina 1 $\mu$ M (Thaps.), inmunodetectando dos marcadores de estrés reticular ERP-57 y XBP1 y un control de carga HSP90. Imagen representativa de 2 experimentos.

Por otra parte, células no transfectadas o con expresiones transitorias de KDEL-RFP de al menos 24 h, no indujeron la acumulación de ERP57, y de Xbp1 (Figura 3 C; primero y segundo carril). Lo que si ocurre en respuesta de la expresión por 48 h de KDEL-RFP o al tratamiento con Thaps. (Figura 3 B).

Estos resultados indican que la expresión transitoria de KDEL-RFP (<24 h) no desencadena la respuesta al estrés. Por lo cual se aplicó este protocolo de transfección en todos los experimentos posteriores, descartando de esta manera posibles artificios producto del estrés de RE.

#### **5.1.2. Visualización del RE en células COS-7 mediante microscopía en células vivas.**

La microscopía de disco rotatorio permite generar imágenes a una alta frecuencia de adquisición minimizando la fototoxicidad y el fotoblanqueo, siendo una herramienta ideal para la visualización de células vivas (Graf et al., 2005). Se estandarizó esta metodología logrando registrar con suficiente resolución espacial y temporal de eventos: (I) convencionales de la dinámica estructural del RE como el deslizamiento de un túbulo y el cierre de un anillo poligonal (Figura 4, I-II), y (II) no convencionales como la deformación de un túbulo (Figura 4, III).

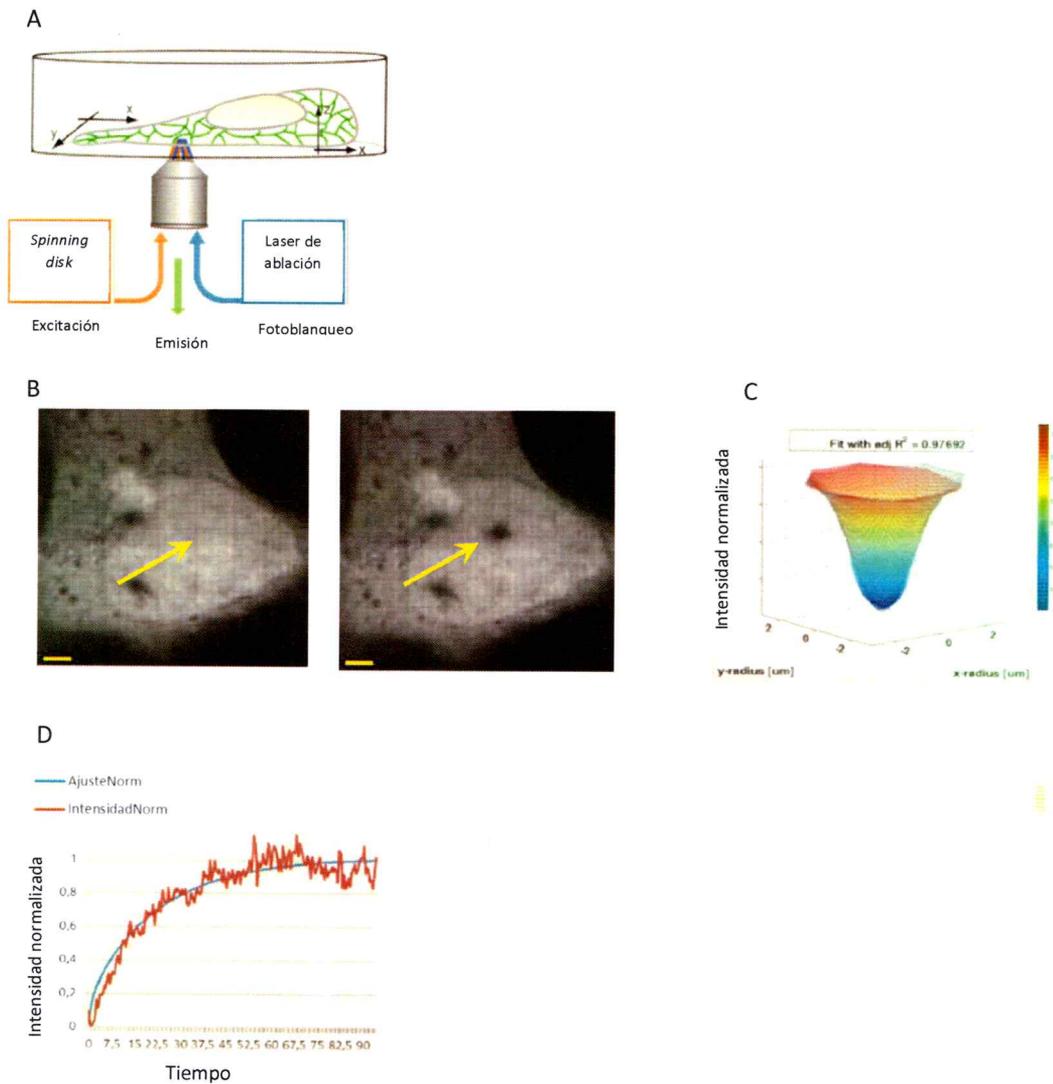


**Figura 4. Visualización de la dinámica estructural del RE en células COS-7.**

Células COS-7 transfectadas con KDEL-RFP, y registradas mediante microscopía confocal. Es posible identificar en una misma célula diferentes eventos de dinámica estructural: (i) crecimiento lento, (ii) cierre de un anillo poligonal y (iii) deformación. Barra de escala 2.5  $\mu\text{m}$ . Imágenes representativas de 80 experimentos.

### **5.1.3. Estandarización y validación de los métodos en microscopía y biofísica para la obtención del coeficiente de difusión (D).**

Experimentos cuantitativos de FRAP requieren el ajuste de un modelo matemático a los datos experimentales, obteniendo la fracción móvil y el coeficiente de difusión (D) (Lippincott-Schwartz et al., 2001). En este trabajo se estandarizó tanto la instrumentación microscópica, como el procesamiento computacional de las imágenes. Por una parte, se calibró la metodología de microFRAP para el fotoblanqueo y registro simultáneo por medio de dos fuentes de iluminación láser independientes y adquisición de imágenes a altas frecuencias (esquemático en la Figura 5 A). Para el cálculo del D y la fracción móvil, se ajustaron los datos experimentales mediante un modelo matemático de ajuste (esquemático en Figura 5 D; detallado en métodos 4.2.6). Este modelo representa una solución empírica de la ecuación de difusión, basada en la aplicación de dos restricciones provenientes del modelo experimental: (i) condición inicial, que cuantifica la geometría tridimensional de la región fotoblanqueada obtenida de manera experimental (Figura 5 B-C); y (ii) condición de borde, que describe si la recuperación de la fluorescencia es completa o si el fotoblanqueo reduce significativamente la fluorescencia total del objeto. En colaboración con el laboratorio de S. Härtel y T Asahi (SCIAN-Lab y Modeling in Scientific Imaging and Visualization Laboratory, respectivamente) se evaluaron estas restricciones y se generó una solución de la ecuación de difusión que fue aplicada al análisis de los datos.



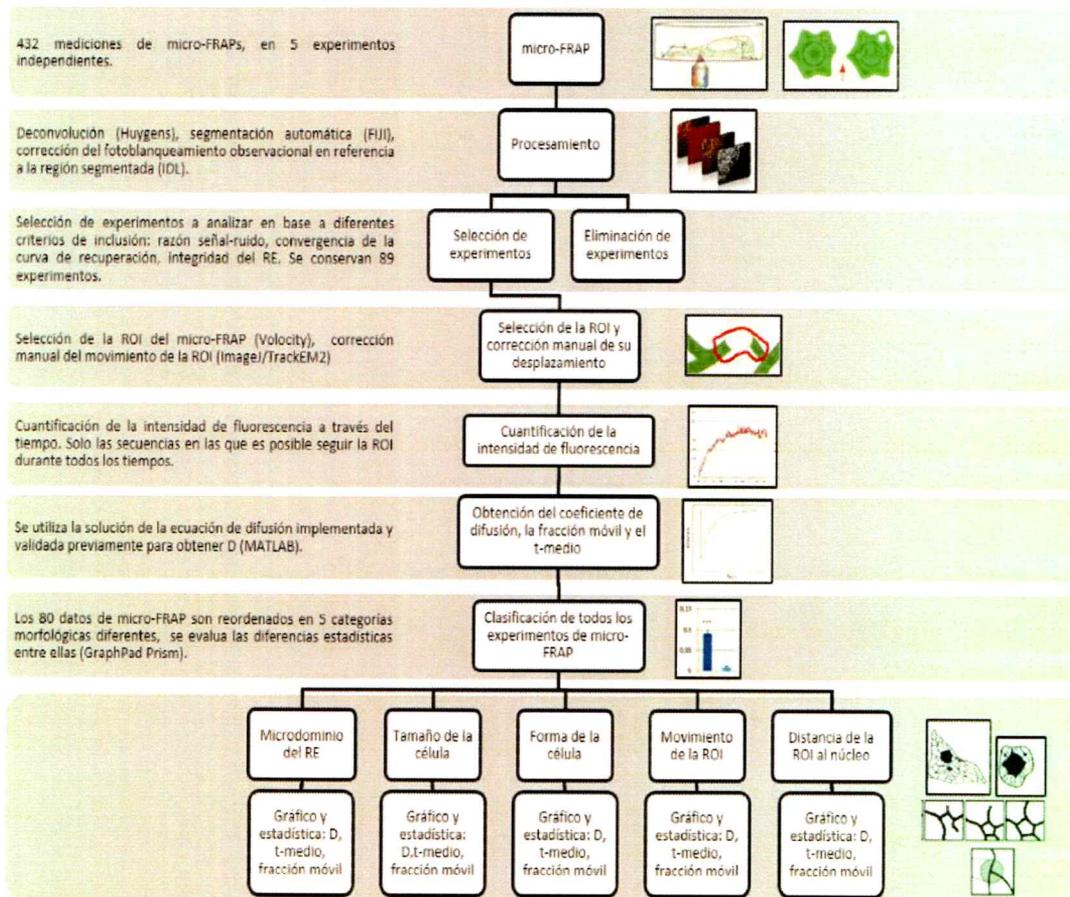
**Figura 5. Diseño experimental y estandarización del microFRAP.**

(A) Ilustración del experimento de microFRAP; una célula COS-7 con un marcador del RE (verde) es fotoblanqueado utilizando un láser pulsado de nitrógeno (flecha azul). Simultáneo al fotoblanqueo se registra la emisión de fluorescencia (flecha naranja excitación, flecha verde emisión). (B) Célula COS-7 transfectadas con el constructo de la proteína EGFP citoplasmática fijadas, y utilizadas para calibrar la posición, forma y tamaño del láser de blanqueo. Barra  $50\mu\text{m}$ . (C) Representación 3D de la intensidad en la región blanqueada, la cual ha sido ajustada a un modelo Gaussiano (malla gris) mediante MATLAB (*Mathworks*). (D) Gráfico del promedio de intensidad en la región fotoblanqueada (intensidad normalizada con el promedio de mediciones previo al fotoblanqueo), a través del tiempo (en segundos; s). Línea roja representa los datos de recuperación de la intensidad de fluorescencia experimentales en una célula típica; línea azul, ajuste matemático de la curva mediante la solución de la ecuación de difusión generada, obteniendo el D y la fracción móvil.

Se aplicó la metodología de análisis de microFRAP, estandarizado el procesamiento de las imágenes mediante una serie de pasos resumidos a continuación (esquemáticos en la Figura 6):

- a) Las imágenes colectadas en estos registros (432 en 5 experimentos independientes) fueron procesadas por una metodología estandarizada en esta tesis, que incluye: deconvolución, segmentación automática y corrección del fotoblanqueo.
- b) Se descartaron registros bajo los siguientes criterios: baja razón señal ruido, comportamiento no exponencial de la curva de blanqueo, ausencia de convergencia en la curva de recuperación, y presencia de daño en el RE, de esta manera reduciendo el total de registros de 432 a 121.
- c) Debido a la alta movilidad del RE y al pequeño tamaño de la región fotoblanqueada, se diseñó y aplicó una nueva manera de cuantificar estos micro-FRAP. Esta metodología consistió en el seguimiento semi-automatizado del microdominio fotoblanqueado durante todo el tiempo de medición, mediante rotaciones y translaciones de la región de interés.
- d) Se registró la tasa de recuperación de la intensidad de fluorescencia, siendo estos datos ajustados a un modelo matemático especialmente diseñado para este propósito. Se descartaron todos aquellos experimentos que no recuperan la fluorescencia, que se alejan del plano focal o que sufren demasiadas transformaciones en su estructura que los hacen difíciles de localizar a través del tiempo. De los resultados de los modelos matemáticos ajustados se obtuvieron los siguientes parámetros: (i) tiempo medio de

recuperación (resultado no mostrado), (ii) coeficiente de difusión (D), (iii) fracción móvil, de esta manera reduciendo al total de registros de 121 a 80.



**Figura 6. Desarrollo experimental del micro-FRAP.**

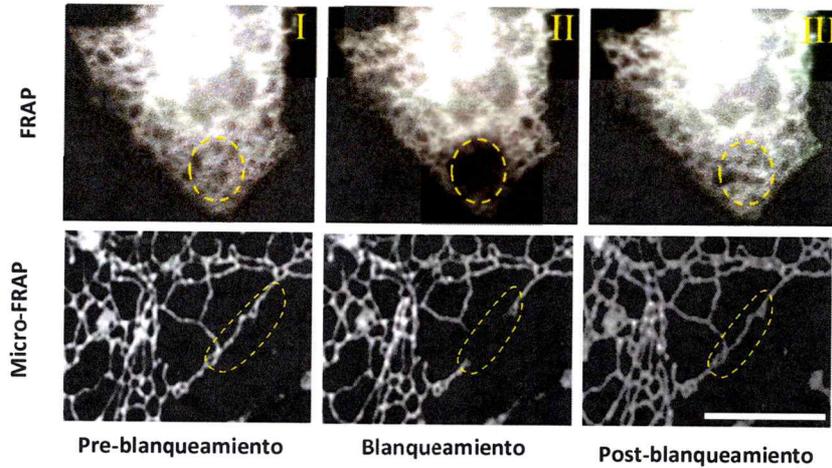
Diagrama que resume paso a paso las etapas del análisis del transporte de proteínas mediante experimentos de micro-FRAP, incluyendo: adquisición de los datos de 432 registros provenientes de 5 experimentos independientes, procesamiento de las imágenes, análisis y clasificación posterior. Indicando, en paréntesis, los diferentes programas computacionales utilizados para desarrollar cada etapa.

#### 5.1.4. Caracterización del transporte de KDEL-RFP en RE de células COS-7.

Con la finalidad de obtener los D en microdominios del RE de células COS-7, se transfectó KDEL-RFP, una proteína luminal fluorescente retenida en el RE, siendo el transporte de esta proteína independiente de interacciones específicas que podrían presentar proteínas endógenas, o de transmembrana del RE.

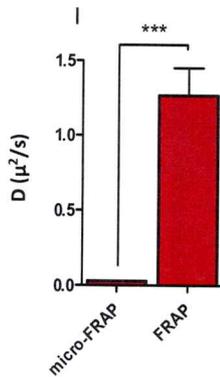
Utilizando KDEL-RFP y la metodología ya estandarizada de microFRAP se logró fotoblanquear microdominios individuales en conjunto con FRAP tradicionales de regiones extensas (Figura 7 A; panel inferior y superior respectivamente). Como resultado del microFRAP se obtuvo un D promedio de  $0.0285 \pm 0.0018 \mu^2/s$  y una fracción móvil de  $124.4 \pm 3.7 \%$  ( $n=80$ ; Figura 7 B; barra izquierda en cada gráfico). Estos valores del D mediante microFRAPs resultaron ser dos órdenes de magnitud menores a los descritos en la literatura (Snapp et al., 2003a), y también dos órdenes de magnitud menores a los valores obtenidos por FRAP de regiones extensas, D de  $1.27 \pm 0.18 \mu^2/s$  y una fracción móvil de  $123.2 \pm 4.3 \%$  ( $n=24$ ) (Figura 7 B; barra derecha de cada gráfico). Por otra parte, los valores de D obtenidos mediante microFRAP en condiciones control mostraron una variabilidad de hasta dos órdenes de magnitud que va desde  $0.1 \mu^2/s$  hasta  $0.01 \mu^2/s$  (Figura 7 C).

A

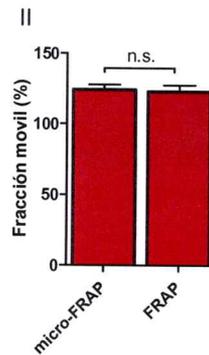


B

Coefficiente de difusión (D)



Fracción móvil



C

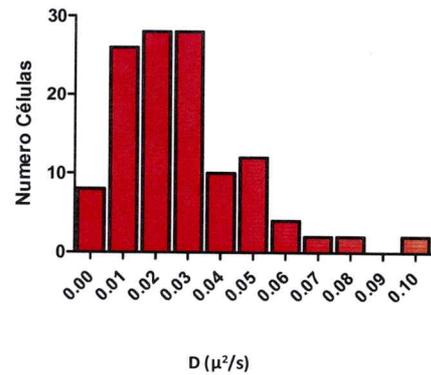
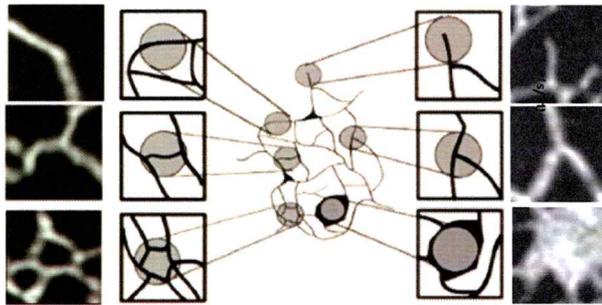


Figura 7. Transporte a través del RE evaluado mediante micro-FRAP.

(A) Células COS-7 transfectadas con KDEL-RFP observando de izquierda a derecha las imágenes representativas antes y después del fotoblanqueo (circunferencia amarilla). En el panel superior observa un FRAP de una región extensa y en el panel inferior un microFRAP, barra 5 μm (B) Gráfico del promedio de los valores de D y fracción móvil, Prueba de *student post hoc Neuman-Keuls*, \*\*\* p<0,01; n.s. no significativo. (C) Histograma de distribución de frecuencia de los valores de D por cada célula evaluada.

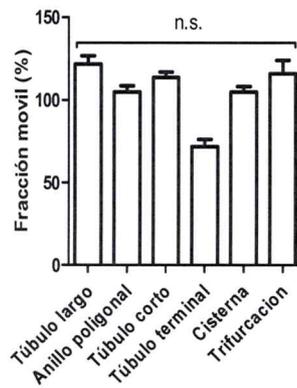
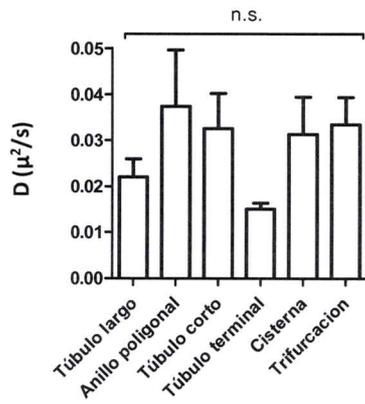
Con la finalidad de correlacionar esta variabilidad con algún elemento estructural del RE, se clasificó cada experimento bajo criterios estructurales de la región fotoblanqueada del RE y de la célula, reagrupando la totalidad de los 80 datos en 5 categorías (detalles de la clasificación en metodologías). Se evaluó la correlación del D, obteniendo como resultado que el transporte a través del RE transcurre de manera independiente del dominio estructural (Figura 8 A), del tamaño (Figura 8 B), de la forma (Figura 8 C), del movimiento de la región fotoblanqueada (Figura 8 D), y de la posición de la región fotoblanqueada relativa al centro de la célula (Figura 8 E). En conjunto estos resultados indican que el D es independiente de las características estructurales del RE, o de la célula.

A

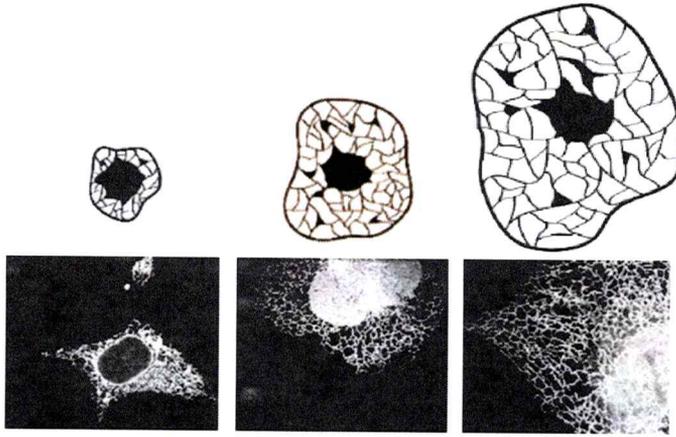


Túbulo largo  
Túbulo corto  
Anillo poligonal

Túbulo terminal  
Trifurcación  
Cisterna



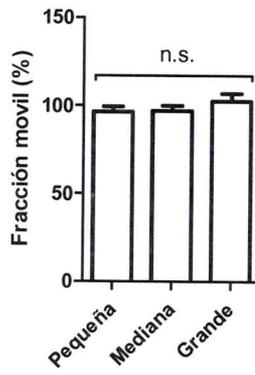
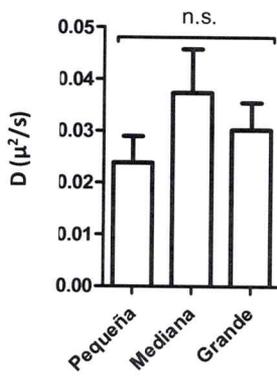
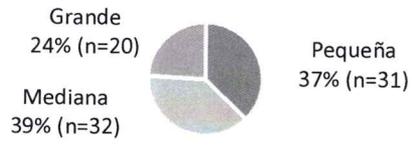
B



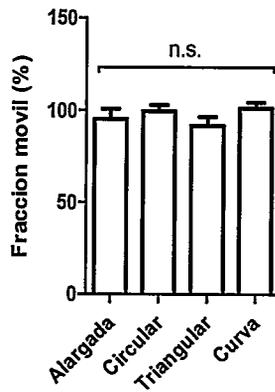
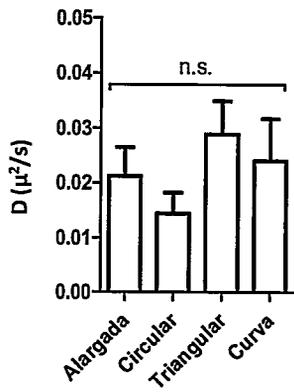
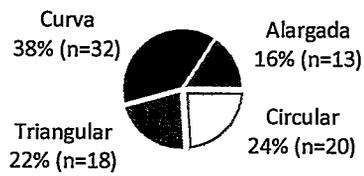
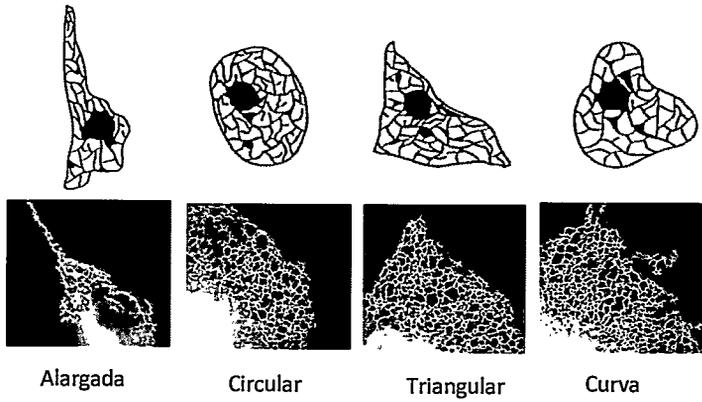
Pequeña

Mediana

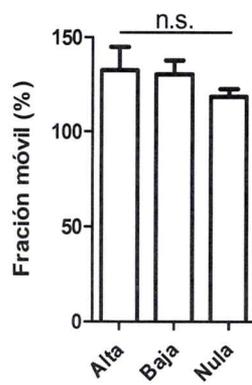
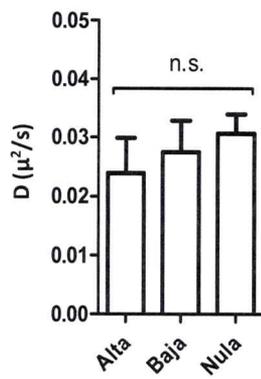
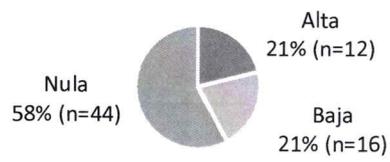
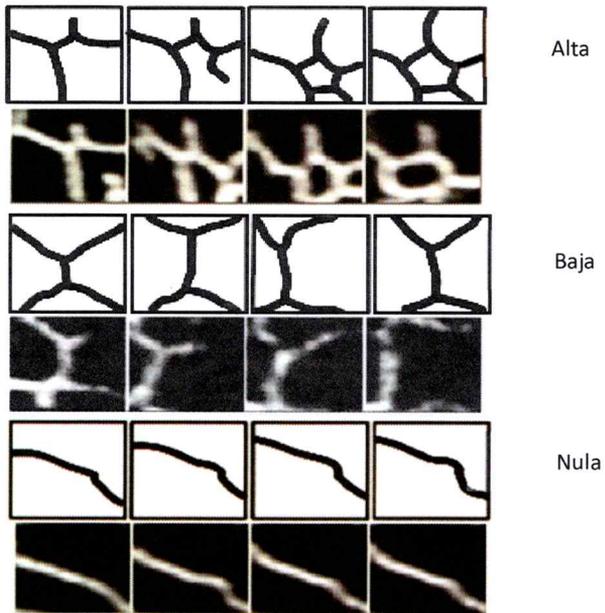
Grande



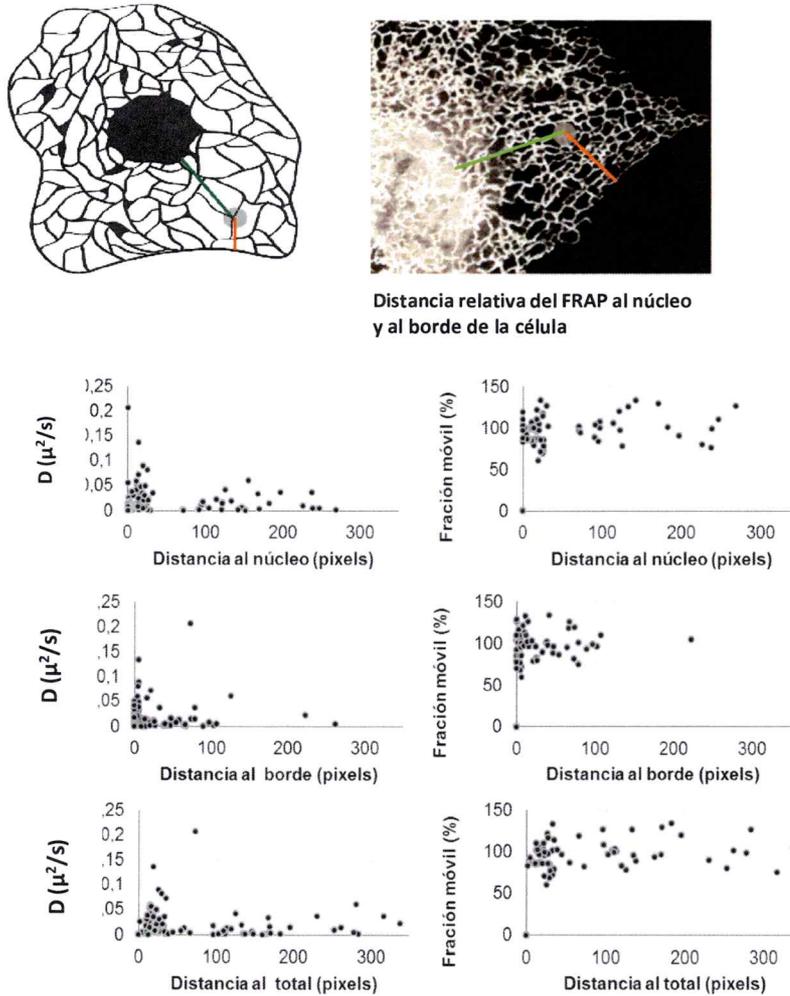
C



D



E



**Figura 8. Evaluación del Coeficientes de difusión (D) y fracción móvil de KDEL-RFP en células COS-7 frente a distintas características estructurales de la célula.**

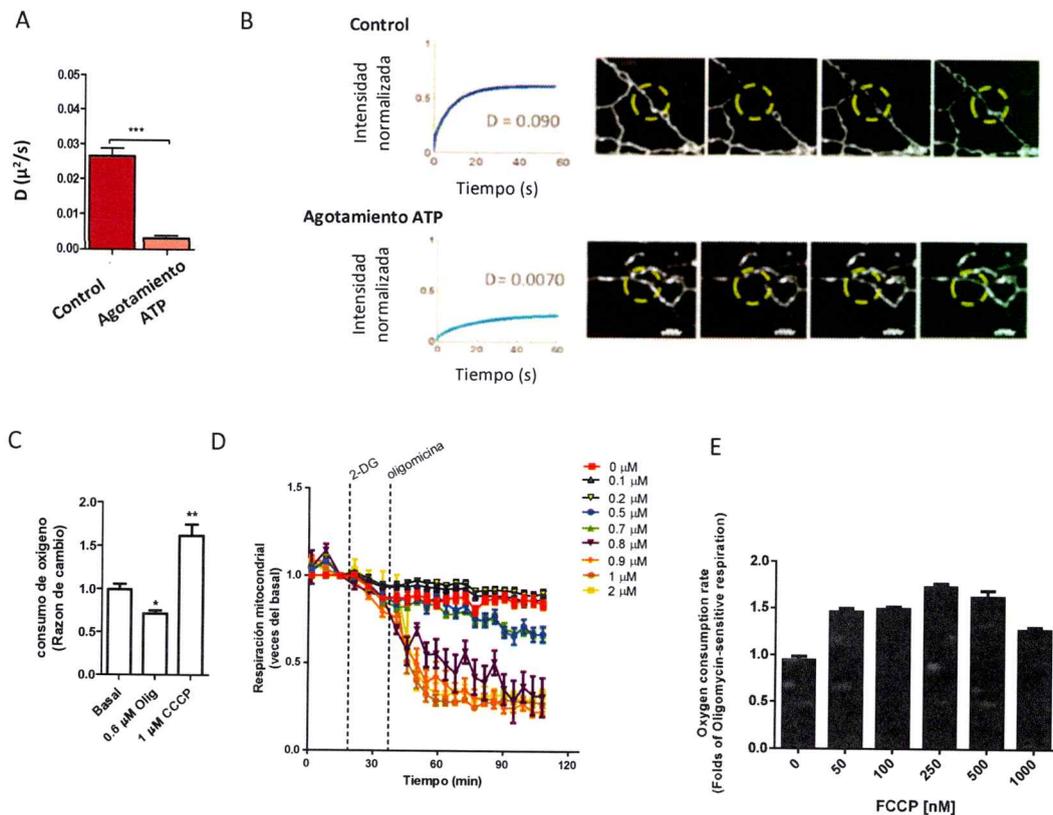
En cada panel de arriba hacia abajo se aprecia: primero, la distribución de la población al ser clasificada; segundo, el promedio de los D y de la fracción móvil; y tercero, un modelo que ilustra la clasificación realizada, junto con una imagen representativa de esta clasificación. (A) Clasificación morfológica de diferentes microdominios presentes en el RE. Imagen representativa 3.3 x 3.3  $\mu\text{m}$ . (B) Clasificación respecto del tamaño de las células. Imagen representativa 42 x 55  $\mu\text{m}$ . (C) Clasificación de las diferentes geometrías que presenta la célula completa. Imagen representativa 42 x 55  $\mu\text{m}$ . (D) Clasificación del movimiento de la región de interés fotoblanqueada (ROI) evaluada durante toda la recuperación de la fluorescencia (300 imágenes adquiridas cada 100 ms). Imagen representativa de tamaño 3.3 x 3.3  $\mu\text{m}$  adquiridas cada 1 s. (E) Mínima distancia desde la zona blanqueada hasta el núcleo (barra anaranjada, gráficos superiores), hasta el borde (barra verde, gráficos centrales) y la suma de ambas distancias (suma de distancia naranja más la verde, gráficos inferiores). Imagen representativa 42 x 55  $\mu\text{m}$ .

### **5.1.5. Efecto del agotamiento de ATP sobre el transporte de KDEL-RFP a través del RE.**

La inhibición farmacológica de la síntesis de ATP es una aproximación demostrada para alterar fenómenos de movilidad subcelular, incluyendo la dinámica estructural del RE (Fang et al., 2010; Vishnu et al., 2014). Se utilizó esta estrategia para corroborar si efectivamente la inhibición total de la movilidad del RE es capaz de modificar el D.

ATP fue agotado mediante la inhibición conjunta de la glicólisis y la fosforilación oxidativa. Para validar las dosis utilizadas se cuantificó secuencialmente el consumo de oxígeno en respuesta a 0.1  $\mu\text{M}$  de Antimicina A, 1  $\mu\text{M}$  de Oligomicina y 10mM de 2-deoxi-D-glucosa, resultando en la disminución de la respiración celular, y a continuación el agente desacoplante CCCP 1  $\mu\text{M}$  que aumentó el consumo de oxígeno, dando cuenta de la viabilidad de las mitocondrias y la integridad de sus membranas (Figura 9 B).

Se aplicó este tratamiento farmacológico evaluando el D mediante microFRAP obteniendo una dramática disminución del D (Figura 9 C). Sin embargo, también se observó la casi nula recuperación de la fluorescencia, (Figura 9 C; (i) curva de ajuste e (ii) imágenes representativas de una condición control, panel superior y el resultado del agotamiento de ATP, panel inferior). La disminución en la fracción móvil es interpretada comúnmente como una fragmentación del RE, dificultando la interpretación de los datos, y restando relevancia a la disminución observada en D.



**Figura 9. Efecto del agotamiento de ATP en el transporte de una proteína fluorescente en un túbulo único.**

(A) D obtenido en condiciones control y con agotamiento de ATP. 10 experimentos independientes, prueba de *student post hoc Neuman-Keuls*, significancia \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,5$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ . (B) Representación gráfica de la curva de ajuste de la intensidad de la fluorescencia en el tiempo posterior al fotoblanqueo en una condición control (gráfico de línea azul, panel superior), como en la condición experimental luego del agotamiento de ATP (gráfico de línea celeste, panel inferior) mediante la incubación con diferentes inhibidores farmacológicos (0.1  $\mu\text{M}$  de Antimicina A, 1  $\mu\text{M}$  de Oligomicina y 10mM de 2-deoxi-D-glucosa durante 45 min a temperatura ambiente). (C) Control positivo de la eficiencia del tratamiento farmacológico en la inhibición de la respiración celular, mediante el registro del consumo de oxígeno con un electrodo de oxígeno tipo Clark. ocho experimentos independientes. (D) Efectos de la Oligomicina sobre la respiración mitocondrial en células COS-7. FCCP y Rotenona y Antimicina (Rot/AA) fueron usados para evaluar el efecto sobre la máxima respiración mitocondrial (12 repeticiones en 3 experimentos independientes). (E) Inhibición total de la cadena transportadora de electrones (8 repeticiones en 3 experimentos independientes).

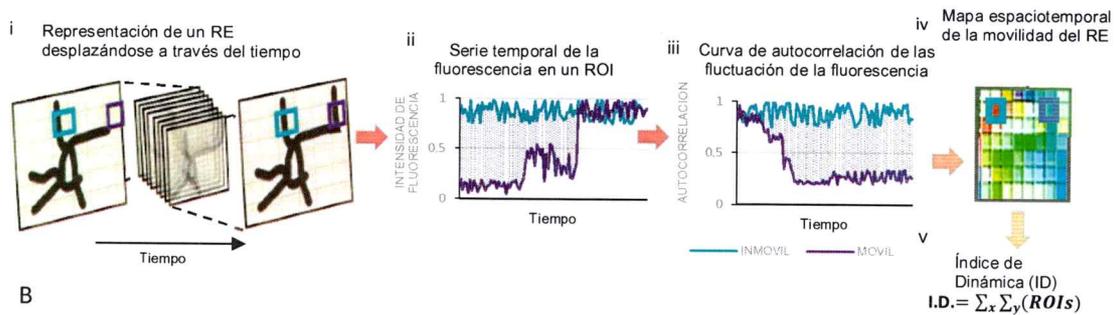
**5.2. Caracterizar la dinámica estructural del RE en imágenes de microscopía de células COS-7, mediante la generación de un índice matemático (índice de dinámica, ID).**

Se generaron dos metodologías de análisis de imágenes de microscopía fluorescente basadas en la cuantificación de los cambios en fluorescencia en una serie temporal de imágenes como se detalla a continuación.

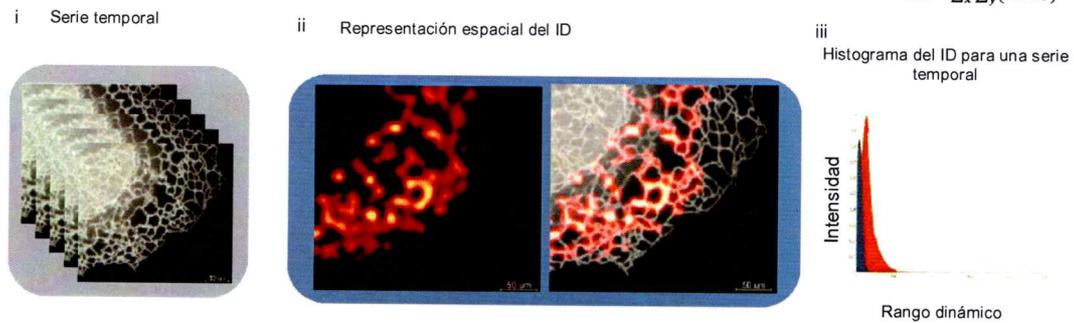
**5.2.1. Generación y validación del índice de dinámica (ID) basado en el análisis de autocorrelación.**

La función de autocorrelación se define como la correlación cruzada de la señal consigo misma. Esta función cuantifica el grado de dependencia lineal que existe entre los valores en todos los instantes de tiempo de manera simultánea (Lippincott-Schwartz et al., 2001). Se estandarizó su aplicación para la detección de procesos estacionarios, donde el valor de esta función es constante, ya que la señal original será igual a otra en cualquier instante de tiempo (esquemático en la Figura 10 A; celeste), y en procesos dinámicos, donde la función de autocorrelación tendrá un valor máximo al inicio para luego disminuir exponencialmente a medida que aumenta el intervalo de desplazamiento evaluado (esquemático en la Figura 10 A; violeta).

## A Análisis de autocorrelación



## B



**Figura 10. Método de cuantificación espatiotemporal de la dinámica estructural del RE mediante autocorrelación.**

(A) De izquierda a derecha: (i) Ilustración esquemática de diferentes imágenes de un RE móvil, y cuantificación de la fluorescencia en dos regiones de interés (ROI) a través de la serie temporal, indicando con un recuadro violeta una ROI móvil y con un recuadro celeste una ROI inmóvil. (ii) Gráfico de la fluctuación de la intensidad de fluorescencia para cada ROI. (iii) Autocorrelograma para ambos gráficos obtenido calculando la autocorrelación en el dominio del tiempo. (iv) Resultados para cada ROI mediante autocorrelación son visualizados en un mapa espatiotemporal de la dinámica estructural del RE (pseudocoloreado como un mapa de calor). (v) Cálculo del índice de dinámica (ID) mediante la sumatoria de las diferencias de la representación espatiotemporal de la autocorrelación. (B) (i) Serie de imágenes adquiridas a través del tiempo; (ii) representación espacial del ID; (iii) histograma de todos los valores del ID obtenidos de las imágenes, y separación de los valores que son considerados móviles (naranja), y los valores que indican ausencia de movimientos (azul).

En la práctica, se obtiene la intensidad de fluorescencia de un ROI (del *inglés region of interest*) de la imagen a través del tiempo (Figura 10 A, i-ii; Figura 11 B, i), se calcula la autocorrelación (Figura 10, iii) obteniendo un coeficiente de la curva de autocorrelación que es representado en un mapa espaciotemporal que resume los resultados de todos los ROIs (Figura 10, vi; Figura 10 B, ii), y finalmente se obtiene un único valor al realizar las sumatorias de todos los ROIs de la imagen (Figura 10 A, v; Figura 10 B, iii).

### **5.2.2. Implementación y validación del ID basado en energía de movimiento en el dominio de las frecuencias**

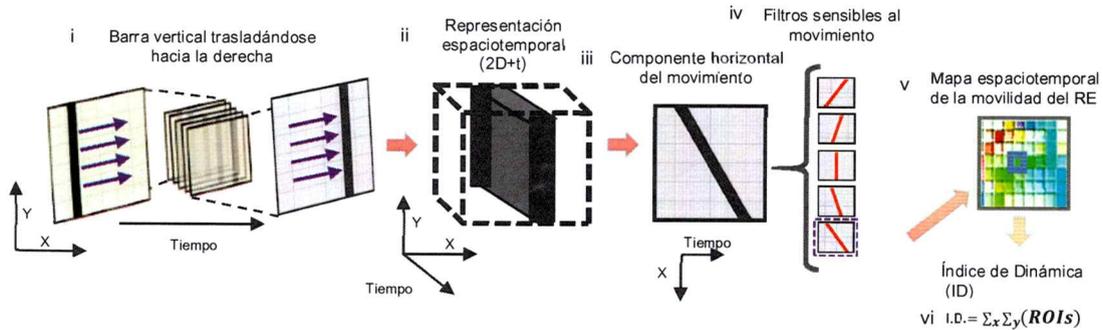
El segundo modelo, de energía de movimiento, está basado en la observación que el movimiento de un borde de intensidad constante se puede representar como una línea en cierta orientación del volumen 3D (2D espacio y 1D tiempo). Esto significa que un filtro detector orientado de manera precisa en este volumen 3D responderá específicamente a objetos desplazándose con una cierta velocidad. En particular, en este modelo se utiliza un filtro de Gabor (una de las implementaciones más sencillas para la detección de bordes orientados), con diferente orientación y escala, con el objetivo de detectar movimientos de diferente dirección y magnitud.

La detección de movimiento basada en energía consiste en filtrar el volumen de datos con un conjunto de filtros (sensibles a diferentes direcciones y magnitudes de velocidad). El modelo de energía de movimiento plantea que para un movimiento particular debe existir un filtro específico en el conjunto de filtros que se active en

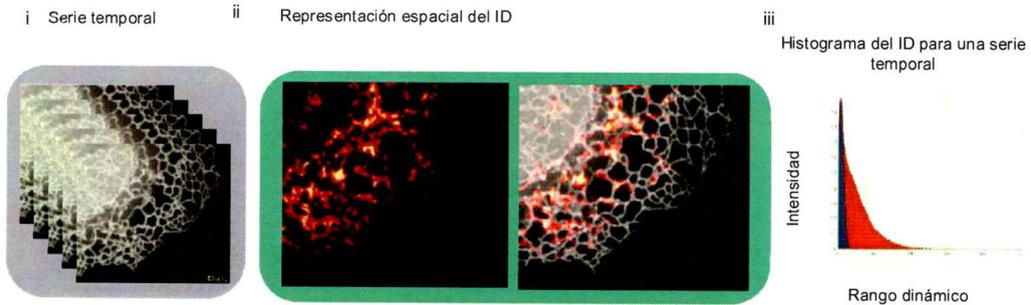
mayor medida. Esta metodología permite por ejemplo comparar 2 clases de movimientos, sin embargo, no entrega exactamente el vector desplazamiento por cada pixel. El modelo utilizado en esta tesis, posee una mejora de lo descrito anteriormente (Heeger, 1988): toma la salida del conjunto de filtros y además la salida esperada para un movimiento ideal, y mediante un proceso de optimización estima el vector desplazamiento por pixel, que es el valor que se utilizará para la descripción del movimiento.

En la práctica se obtiene la intensidad de fluorescencia de un ROI de la imagen a través del tiempo, la que es representada como un cubo 3D (2D espacio, 1D tiempo, Figura 11 B, i-ii), se calcula y reorienta el cubo 3D eliminando la dimensión vertical (Figura 11 B, iii), y se evalúa con las diferentes rotaciones del filtro de movimiento (Figura 11 B, iv). Para facilitar la detección de estos movimientos estas operaciones han sido implementadas en el dominio de las frecuencias calculadas mediante la transformada de Fourier, y para el uso adecuado de los filtros de movimiento estos deben ser individualmente validados previamente en un modelo que conozcamos posee cierto movimiento. Al concluir el análisis se obtiene una serie de valores para cada filtro, el cual es posible de representar en un mapa espaciotemporal que resume los resultados de todos los ROIs y de todos los filtros (Figura 11 B, vi). Finalmente se obtiene un único valor al realizar las sumatorias de estas variaciones sobre cierto umbral de todos los filtros seleccionados, y de todos los ROIs de la imagen (Figura 11 B v).

## A Análisis de energía de movimiento



## B



**Figura 11. Método de la cuantificación espaciotemporal de la dinámica estructural del RE mediante energía de movimiento.**

(A) De izquierda a derecha: (i) Ilustración esquemática de diferentes imágenes de una barra desplazándose a la derecha a través del tiempo, indicando con flechas violetas el sentido del desplazamiento. (ii) Representación espaciotemporal de una estructura 3D inserta en un cubo (2D espacio-1D tiempo). (iii) Orientación del cubo que elimina la dimensión vertical y permite visualizarse el cambio en el movimiento como un cambio en la orientación espacial. (iv) Filtros con diferente orientación espaciotemporal pueden utilizarse para detectar específicamente un tipo de movimiento. En el recuadro violeta se destaca el filtro que coincide con el movimiento de la figura. (v) La energía de movimiento es calculada en diferentes ROI de la imagen y resumida para ser visualizada un mapa espaciotemporal, (pseudocoloreado como un mapa de calor). (vi) Cálculo del ID mediante la sumatoria de las diferencias de la representación espaciotemporal de la energía de movimiento.

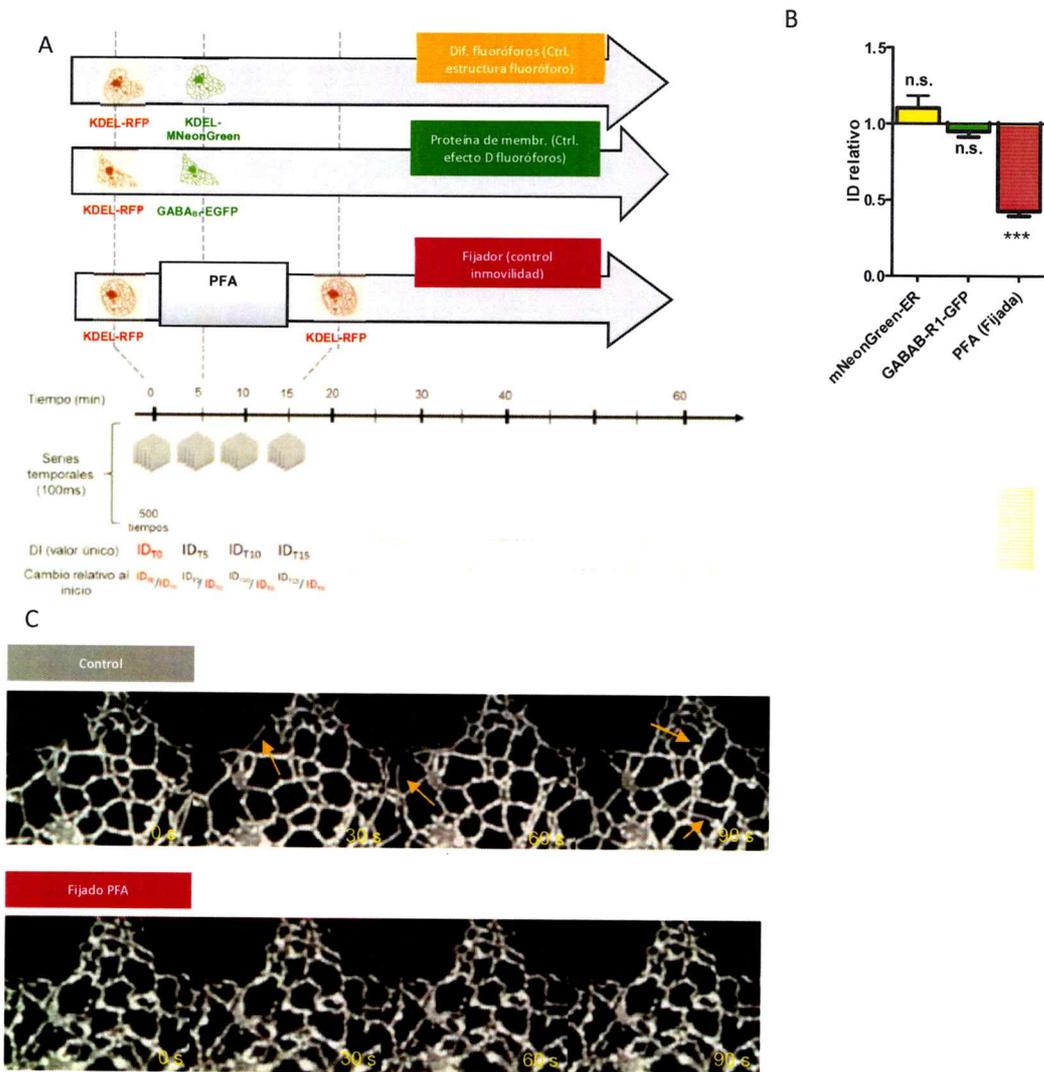
(B) (i) Serie de imágenes adquiridas a través del tiempo; (ii) Representación espacial del ID; (iii) Histograma de todos los valores del ID obtenidos de las imágenes, y separación de los valores que son considerados móviles (naranja), y los valores que indican ausencia de movimientos (azul).

Las dos metodologías formuladas son efectivas en generar un ID a nivel global y local, sin embargo, se requiere de una extensa validación que considere las restricciones matemáticas y del tipo de modelo biológico, para dar una correcta interpretación de los valores de ID obtenidos.

### **5.2.3. Validación del ID en células vivas.**

Debido a que el ID evalúa fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia, su capacidad para evaluar la dinámica estructural podría ser modificada por diferentes variables como: la naturaleza del fluoróforo (brillo, estabilidad, maduración, agregación); la difusión de la proteína; y la razón señal ruido. Por este motivo se evaluaron biológicamente estas tres variables, mediante tres experimentos complementarios detallados a continuación (resumidos en la Figura 12 A).

Lo primero fue demostrar que el ID es independiente de la proteína fluorescente utilizada, incluso cuando presentan diferencias en el brillo, el fotoblanqueo, el tiempo de maduración, el tamaño, la fotoestabilidad y la agregación entre otras propiedades relevantes en un fluoróforo (Snapp, 2009). Para ello se cotransfectaron dos proteínas luminales, KDEL-RFP y KDEL-mNeonGreen, la proteína más brillante descrita a la fecha (Shaner et al., 2013). Primero se obtuvo el ID registrando la emisión de KDEL-RFP y posteriormente (5 min.) se evaluó el ID registrando la emisión de KDEL-mNeonGreen en la misma célula (resumido en la Figura 12 A; flecha superior). El resultado de estos dos ID se expresó como la razón ID KDEL-mNeonGreen/ KDEL-RFP.



**Figura 12. Evaluación de la eficiencia del ID en células vivas.**

(A) Resumen gráfico del diseño experimental que ilustra la progresión de cada experimento, indicando con células de diferente color las proteínas que fueron transfectadas o cotransfectadas, la línea punteada indica los intervalos de tiempos en los que fueron adquiridas las imágenes, representando que siempre fueron realizadas dos mediciones sobre la misma célula. Esquema inferior representa la adquisición de películas en cada uno de los tiempos indicados y como estos datos fueron normalizados contra la condición control inicial para la representación del ID (B) ID obtenido para cada condición experimental, normalizado con el ID obtenido con una proteína fluorescente de diferente brillo y tamaño, (7 experimentos independientes) una proteína fluorescente que es transportada más lentamente, (8 experimentos independientes) y una condición de inmovilidad mediante la fijación química del RE (10 experimentos independientes). (C) Imágenes representativas de la video-microscopía de una misma célula antes y después de ser inmovilizada mediante fijación. Flechas indican algunos de los eventos dinámicos entre cada fotografía. Prueba de *student post hoc Neuman-Keuls* \*\*\*  $p < 0,01$ ; n.s. no significativo.

De acuerdo a lo esperado, el ID registrado en una misma célula con diferentes fluoróforos no presentó diferencias significativas, siendo cercano a uno (Figura 12 B; barra amarilla). Indicando que el ID no es afectado por el aumento en el brillo, el cambio en la longitud de onda, o el aumento en la razón señal ruido del fluoróforo.

La movilidad de la proteína fluorescente luminal al interior del RE (i.e. KDEL-RFP) genera fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia las que son consideradas en el protocolo del ID eliminando texturas mediante filtros de texturas sobre las imágenes (detallado en la sección de metodologías). El éxito de este procedimiento fue evaluado cotransfectando KDEL-RFP y GABAB1-GFP, una proteína de transmembrana que no es capaz de abandonar el RE en ausencia de dimerización (Couve et al., 2000). El ID fue el mismo para ambas proteínas fluorescentes (Figura 12 A y B). Debido a que es aceptado que proteínas con segmentos de transmembrana se transportan al menos un orden de magnitud más lento que proteínas luminales (Snapp et al., 2003a) estos datos indican que las variaciones en el transporte del marcador fluorescente no afectan el valor del ID.

Por último, se evaluó el ID en una célula antes y después de ser inmovilizada completamente con paraformaldehído (PFA). El PFA cataliza eventos de entrecruzamiento de proteínas resultando en la detención de la dinámica estructural del RE, pero conservando su estructura tubular (Figura 12 C). Consistente con nuestras predicciones el ID fue significativamente menor en la condición fijada (Figura 12 B; barra rosada). Estas observaciones demuestran la sensibilidad y robustez del ID en el modelo biológico utilizado

#### 5.2.4. Validación del ID mediante simulaciones computacionales de la dinámica estructural del RE.

La introducción de nuevas métricas de cuantificación requiere extensivas validaciones en el sistema que otorgue mayor precisión (en inglés *gold standard*). En ausencia de estas, las métricas pueden no detectar los cambios deseados en el sistema biológico a las que se someten por primera vez. Para abordar esta problemática se generaron modelos simulados del RE para evaluar la utilidad del ID.

El uso de un modelo simulado de RE móvil requirió en primera instancia identificar las características precisas más relevantes de la estructura del RE del modelo utilizado en esta tesis. Para ello se seleccionaron propiedades mínimas de la adquisición de los datos experimentales: tamaño (cantidad de píxeles de la imagen), textura (perfil de intensidad de la fluorescencia en el túbulo), escala (grosor del túbulo en píxeles) y algunas características de la dinámica, como la resultante de eventos de crecimiento, ausencia de fisión; resumidas en la Figura 13 A.

A

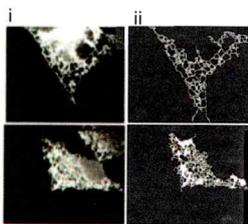
Simulaciones computacionales del RE mediante modelos simplificados de la dinámica estructural del RE

Tipo de característica simulada	Especificación	Semejanza con RE experimental	Observación
Tamaño	Numero de pixeles de la imagen 512x672 pixel	++++	Tamaños idénticos
Escala	Grosor de un túbulo en pixeles 5-6 pixeles	++++	Diferencias debidas a la desviación estándar de los valores experimentales
Textura	Perfil de intensidad Gaussiano	++++	Basado en la función de distribución de la luz, y no incluyendo un modelo de ruido
Dinámica	Numero de eventos de crecimiento 5-10 eventos en 500 imágenes	+++	Aproximada, se desconoce con precisión el dato real

Simbología

++++ Idéntico a lo descrito; +++ Desconocido; + Contrario a lo esperado.

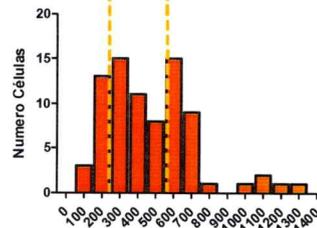
B



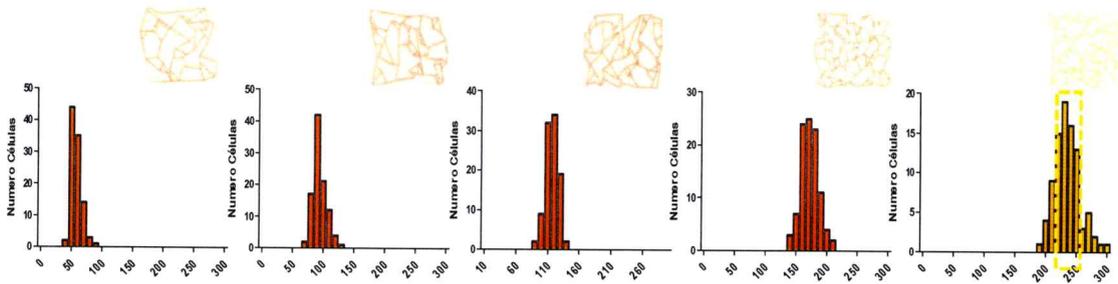
C



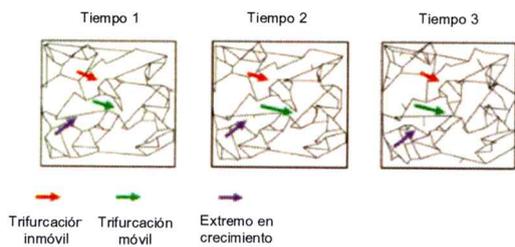
D



E



F



**Figura 13. Simulaciones de la estructura y la dinámica estructural del RE basadas en la caracterización estructural del RE de células COS-7.**

(A) Cuadro resumen de parámetros estructurales y de escala de las imágenes, consideradas en la generación de las simulaciones de RE. (B) Procesamiento de imágenes en la esqueletonización, (i) dos imágenes representativas con diferente densidad de trifurcaciones (panel superior e inferior) obtenidas mediante microscopía confocal de disco rotatorio de RE de una célula COS-7; (ii) imagen binaria, resultado de la segmentación semi-automática; (iii) esqueletonización, con inserto que permite visualizar los detalles. (C) Esquema que destaca en color naranja lo que es considerado trifurcación, e inmediatamente abajo, los valores estimados para cada uno de los ejemplos. (D) Histograma de distribución del número de trifurcaciones, con una línea amarilla punteada se indican los máximos locales correspondientes al percentil 25% y al percentil 75% (E) En cada panel se observa arriba la imagen representativa de una simulación de RE, abajo histograma del número de trifurcaciones en cada simulación de RE, calculada mediante esqueletonización; de izquierda a derecha los recuadros representan 5 simulaciones representativas de 100 que fueron realizadas en donde aumenta progresivamente el número de trifurcaciones con las cuales fueron inicializadas (F) Imágenes representativas de una simulación de RE móvil generadas mediante *MATLAB (Mathworks)*. en donde la dinámica estructural es generada mediante el crecimiento de túbulos (flecha morada), y el desplazamiento al azar de trifurcaciones (flecha verde). El aumento en la movilidad de la red es generado únicamente aumentando la proporción de trifurcaciones móviles por sobre las trifurcaciones inmóviles (flechas rojas) manteniendo constante el número inicializado.

Con el objetivo de obtener los parámetros biológicos relevantes de la estructura del RE, se utilizaron imágenes de RE de células COS-7, que fueron analizadas mediante esqueletonización. La esqueletonización de imágenes binarias es una poderosa herramienta para caracterizar la estructura de geometrías complejas como el RE, y su aplicación permite obtener múltiples parámetros morfológicos a partir de imágenes de microscopía (Alcayaga, 2012). Trabajos previos de nuestro laboratorio desarrollaron un método de esqueletonización validado para la cuantificación de RE de células COS-7 (Alcayaga, 2012). El cual consiste en los siguientes pasos, (i) obtención de imagen deconvolucionada; (ii) generación de imagen binaria, mediante segmentación semi-automatizada; (iii) esqueletonización, generando una serie de descriptores estructurales siendo el número de trifurcaciones el más simple de interpretar (Figura 13 B).

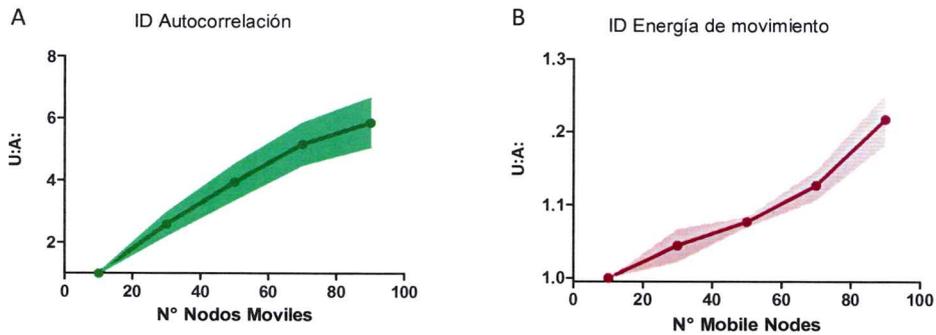
Se aplicó la esqueletonización en 80 células, encontrándose que el número de trifurcaciones promedio de una célula COS-7 fue de  $465 \pm 255$  (percentiles 25%, 273; 75%, 617 trifurcaciones por células). El parámetro de trifurcaciones presentó dos máximos locales (Figura 13 C, líneas segmentadas amarillas). Estos resultados sugieren la existencia de dos poblaciones diferentes de células, con baja y alta densidad de trifurcaciones. En los experimentos sucesivos de cuantificación del ID se seleccionaron únicamente células que corresponden a la población de baja densidad de trifurcaciones (cerca al percentil 25%, 273 trifurcaciones por célula).

El parámetro de trifurcaciones se utilizó para generar simulaciones de la estructura del RE. Se generaron 100 diferentes simulaciones del RE, modificando el número total de trifurcaciones con las cuales fueron iniciadas. Debido a que la simulación considera aspectos dinámicos, cada RE simulado puede presentar un

número mayor de trifurcaciones a los iniciales, lo cual le otorga una desviación acorde al modelo biológico. Para conocer el número de trifurcaciones de las simulaciones de RE, estas fueron cuantificadas de manera idéntica a las células COS-7 (solo cambiando la segmentación semiautomática por un método automatizado). Cada una de las simulaciones fue repetida 100 veces, y el número de trifurcaciones fue extraída de los datos de esqueletonización y representado mediante un histograma, (Figura 13 C; ejemplos representativos e histogramas para inicializaciones de 50, 60, 80, 150, y 200 trifurcaciones respectivamente). Se identificó la simulación que presentaba mayor semejanza al criterio biológico de número de trifurcaciones establecido anteriormente, siendo la simulación inicializada con 200 trifurcaciones la más semejante (Figura 13 E; recuadro línea segmentada amarilla). De esta manera se obtuvo una simulación de RE que posee características similares a nivel de tamaño, textura, escala, y estructura del RE biológico, la cual será utilizada para la generación de las simulaciones de RE dinámico.

Utilizando como base la estructura simulada de RE, se introdujeron dos mecanismos para la modificación de la estructura, y la consecuente generación de dinámica estructural: (i) eventos de crecimientos de nuevos túbulos a partir de otro preexistente (Figura 13 F; flechas violeta); y (ii) aumento en el número de trifurcaciones móviles, desplazadas aleatoriamente (Figura 13 F; flechas verdes). El desplazamiento de la trifurcación implica el movimiento de todo el tubo conectado a esa trifurcación, consiguiendo que aumentos en el número de trifurcaciones móviles tengan gran impacto en la dinámica global de la red (Figura 13 F; imágenes representativas de una serie móvil de imágenes de RE simulado).

Utilizando las simulaciones de RE dinámico se evaluó a continuación el ID por análisis de autocorrelación y por energía de movimiento. De manera importante, ambos ID aumentaron progresivamente a medida que aumentó la proporción de trifurcaciones móviles manteniendo constante las trifurcaciones totales (Figura 14 A y B). Estos resultados demuestran que los ID desarrollados en base a autocorrelación y a energía de movimiento son efectivos para medir cambios en la dinámica estructural de una simulación de RE de una célula COS-7.



**Figura 14. Validación del ID mediante simulaciones computacionales de la dinámica estructural del RE.**

Cálculo del ID en RE simulado. El ID graficado es obtenido mediante la normalización del ID en una breve secuencia de 500 imágenes, normalizado con el ID obtenido al inicio de la secuencia temporal. El eje X representa la variación en el número de trifurcaciones móviles -un incremento en este valor indica un aumento en la dinámica estructural del RE simulado. Resultado de la normalización se obtienen diferentes valores de ID en unidades arbitrarias (U.A.) a medida que se incrementa la dinámica estructural. Las gráficas son resultado de la aplicación de dos métodos para de obtención del ID: (A) Autocorrelación y (B) Energía de movimiento.

### **5.2.5. ID del RE en respuesta a modificaciones de la estabilidad de los MTs.**

Como se mencionó anteriormente, el citoesqueleto de MTs es el principal generador de la dinámica estructural del RE en células animales (Tabla 1, columna 8; relevancia del citoesqueleto). Además, alteraciones de sus propiedades son ampliamente utilizadas para modificar selectivamente los mecanismos de la dinámica estructural del RE.

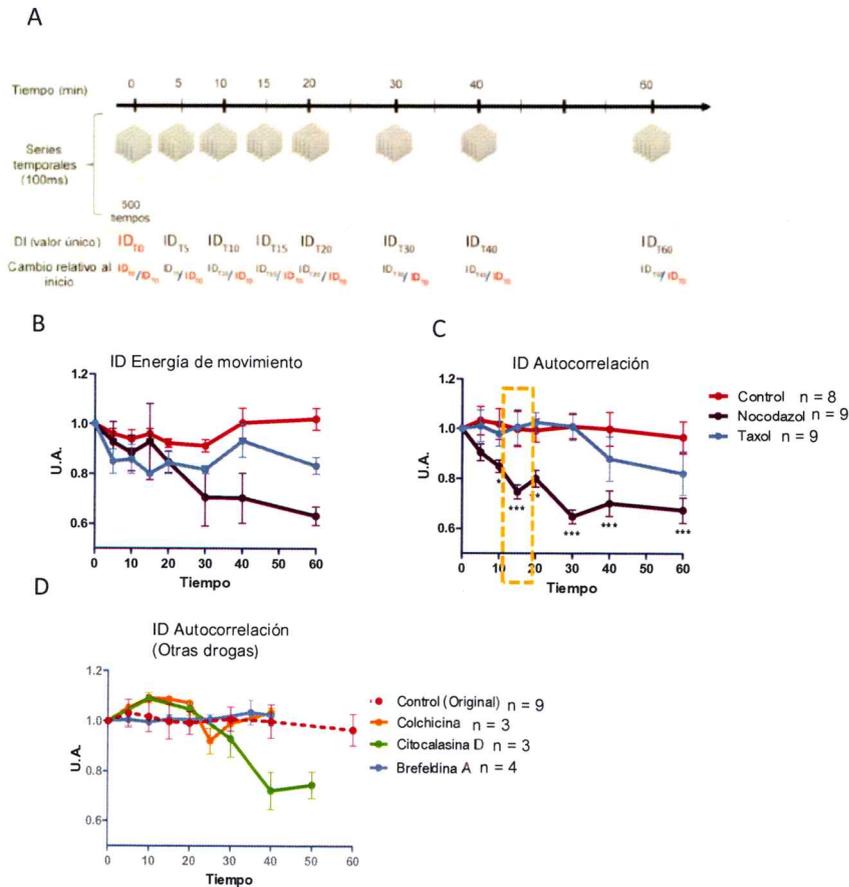
Con el objetivo de obtener una curva de correlación entre el ID y cambios en la dinámica estructural de RE de células COS-7, se diseñó un experimento adquiriendo el ID en el tiempo, en respuesta a tratamientos farmacológicos que alteran la estabilidad de los MTs (Figura 15 A). Esto fue realizado, mediante animaciones a una alta resolución temporal (500 imágenes cada 100ms, cubos grises, Figura 15 A), realizando 8 registros en el lapso de una hora (tiempos en minutos indicados sobre la flecha; Figura 15 A). Con la finalidad de evitar ambigüedades en el ID, debido al tamaño de la célula y la cantidad inicial de RE, se normalizó la medición de cada secuencia temporal por el ID obtenido en el tiempo 0 inmediatamente después de adicionar la droga o el vehículo, (Figura 15 A).

Utilizando este protocolo experimental se evaluó el cambio en el ID en el tiempo mediante el método de energía de movimiento y el método de autocorrelación en respuesta a drogas que alteran la estabilidad de los MTs (Figura 15 B y C respectivamente). En condiciones control se observó que el ID se mantuvo constante durante 60 min. (Figura 15 B-C; curva rosada), estableciendo una línea base de comparación para los experimentos posteriores. Luego se procedió a

aplicar drogas de conocido efecto sobre la estabilidad de los MTs: Nocodazol 5  $\mu$ M (Friedman et al., 2010b) y Taxol a 10  $\mu$ M (Galan et al., 2011). Las estimaciones del ID indicaron que únicamente el tratamiento con Nocodazol modificó significativamente el ID generado por autocorrelación, y no el ID generado por energía de movimiento (Figura 15 B-C; curva violeta), siendo también ineficaz el tratamiento con Taxol (Figura 15 B-C; curva celeste). Se identificó el mínimo tiempo exposición a Nocodazol en el que se produjeron cambios significativos en el ID evaluado por autocorrelación (Figura 15 C; línea segmentada amarilla, tiempo y concentración aplicados en objetivo 5.3), estableciendo las condiciones para realizar los experimentos del objetivo final

También se evaluó si otros tratamientos que afectan el correcto funcionamiento de la célula eran capaces alterar el ID: (i) Colchicina, la cual inhibe la polimerización de los MTs, (ii) Brefeldina A, que inhibe el transporte de RE al aparato de Golgi, o (iii) Citocalasina D, que impide la polimerización y elongación de los microfilamentos (Presley, 2005). Colchicina y Brefeldina A no modificaron el ID (Figura 15 D; curva naranja y celeste), dando cuenta de la especificidad de la respuesta del ID. El tratamiento con Citocalasina D sí modificó el ID en tiempos largos de exposición al fármaco (Figura 15 D; curva verde), sin embargo, las células presentaron severos cambios estructurales que impiden el cálculo correcto del ID.

En resumen, estos resultados validan el uso del ID para medir cambios en la dinámica del RE y establecen una metodología para la disminución del ID mediante la aplicación de Nocodazol.



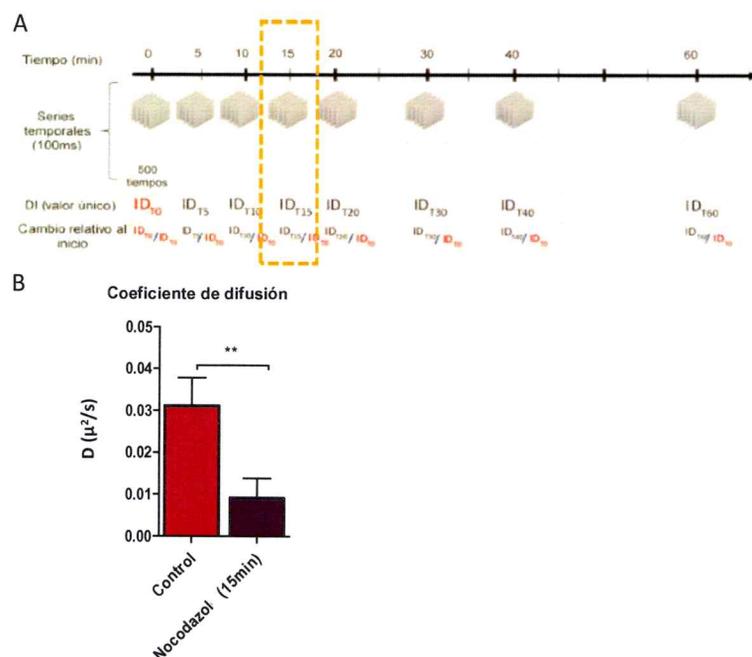
**Figura 15. Cambios en el ID al alterar progresivamente la estabilización del citoesqueleto.**

(A) Diseño experimental, indicando los diferentes intervalos de tiempos, y el cálculo del ID. (B-C) Evaluación del ID obtenido mediante energía de movimiento y autocorrelación respectivamente, en condición control (solo con el vehículo DMSO al 1%; 8 experimentos independientes) o con drogas que aumentan o disminuyen los MTs a dosis previamente reportadas (Taxol 10  $\mu$ M y Nocodazol 5  $\mu$ M, respectivamente; 9 experimentos independientes cada uno), evaluando sobre una misma célula a medida que se aumenta el tiempo de exposición al fármaco. Se destaca en un cuadro amarillo el tiempo seleccionado para el experimento del objetivo específico 5.3. (D) Evaluación de la especificidad de ID evaluado mediante autocorrelación luego del tratamiento con otras drogas que afectan diferentes estructuras subcelulares, control (solo con el vehículo DMSO al 1%; 9 experimentos independientes) Colchicina (3 experimentos independientes), Citocalasina D (8 experimentos independientes), Brefeldina A (4 experimentos independientes)). Prueba de *student post hoc Neuman-Keuls*, \*\*\*  $p < 0,01$ .

**5.3. Evaluar la correlación entre ID y micro-FRAPs mediante tratamientos farmacológicos que modifican la dinámica estructural en células COS-7.**

**5.3.1 Correlación entre modificaciones del ID y el D a través del RE.**

Con el objetivo de evaluar la correlación entre la dinámica estructural y transporte de proteínas, se modificó el ID aplicando tratamiento de 15 min. con Nocodazol 5  $\mu\text{M}$ , y mediante microFRAPs se obtuvo el D antes y después de modificar el ID. El tratamiento con Nocodazol produjo una disminución significativa del D medido en una misma célula (Figura 16 B). Estos resultados destacan el éxito en la evaluación simultánea de dos parámetros celulares, mostrando que el D y el ID se correlacionan bajo las condiciones evaluadas, relación que no ha sido descrita previamente. A pesar de ello, experimentos complementarios deberán corroborar este hallazgo.



**Figura 16 Coeficiente de difusión posterior a la disminución en la dinámica estructural.**

(A) Diseño experimental indicando que se realizan series de imágenes en diferentes intervalos de tiempos, en cada serie de imágenes se calcula un ID el cual es normalizado en función del ID inicial. Se destaca en un recuadro amarillo el tiempo seleccionado a partir de los resultados del objetivo específico 2 para ser aplicado en este experimento. (B)  $D$  obtenido en condiciones control y luego de 15 min de tratamiento con Nocodazol 5  $\mu M$ . Se evidencia modificación en el  $D$  de células sometidas a tratamiento en condiciones que sabemos que el ID es modificado. Prueba de *student post hoc Neuman-Keuls*, significancia \*\*  $p < 0,05$ .

## 6.- DISCUSIÓN

La descripción cuantitativa de la movilidad subcelular, tanto de macromoléculas como de organelos, es fundamental para la construcción de modelos biofísicos precisos que contribuyan a la comprensión de la relevancia de estas propiedades. Los abordajes de esta problemática requieren un enfoque multidisciplinario que considere aspectos de biología celular, biología molecular, microscopía, procesamiento de imágenes y modelamiento físico.

Avances recientes en el desarrollo por ejemplo de: microscopios ópticos cada vez más rápidos en la adquisición y de mejor resolución, de proteínas fluorescentes más brillantes y menos tóxicas y de métodos computacionales para el procesamiento y análisis automatizado, han permitido entender en mayor profundidad procesos de la movilidad subcelular, a nivel de organelos o macromoléculas individuales.

### 6.1. Cuantificación del transporte de proteínas por FRAPs en células vivas.

En las últimas décadas las técnicas de microscopía en células vivas han revelado el carácter dinámico y adaptable de los diferentes procesos de transporte que suceden al interior de una célula. En particular, el uso de FRAP fue introducido con la finalidad de estudiar el movimiento de proteínas en células vivas (Axelrod et al., 1976; Koppel et al., 1976), y está basado en el análisis del incremento en la fluorescencia en el tiempo en una región de la muestra previamente sometida a

fotoblanqueo a través de alta intensidad de iluminación, y dependiendo de la sofisticación del análisis de datos, los resultados pueden indicar cambios cualitativos o cuantitativos.

Típicamente los experimentos de FRAP realizados en el RE fotoblanquean una extensa región de la red (Costantini and Snapp, 2013; Valenzuela et al., 2014). De esta manera, la recuperación de toda la región fotoblanqueada tardará más tiempo, permitiendo que la adquisición de imágenes sea más lenta con mayores tiempos de exposición, generando imágenes con una mejor razón señal ruido.

La aplicación exitosa de microFRAP en células vivas es una tarea técnica especialmente demandante si el objetivo es la evaluación de componentes subcelulares a una gran resolución temporal y espacial. El correcto desarrollo y aplicación de microFRAPs en RE requiere del trabajo multidisciplinario como fue abordado en este trabajo (Castañeda et al., 2014).

microFRAPs han sido aplicado exitosamente para cuantificar el transporte en bacterias y pequeños microdominios estructurales en ellas (Elowitz et al., 1999), resultando en sorprendentes mediciones de un  $D$  once veces más lento que el agua  $7,7 D$  ( $\mu^2/s$ ) y significativamente más lento que en una célula eucarionte ( $27 \mu^2/s$ ) (Swaminathan et al., 1997) o en una mitocondria ( $20-30 \mu^2/s$ ) (Partikian et al., 1998). Lo cual da cuenta de la información adicional que permite la implementación de esta técnica en el estudio de microdominios estructurales.

## **6.2. Cuantificación del transporte al interior del RE mediante microFRAP**

En esta tesis el correcto cálculo del D en RE requirió suponer condiciones del sistema a evaluar incluyendo: infinita cantidad de fluoróforo total, (comparado con los fotoblanqueados), rápido fotoblanqueo, recuperación, y conocimiento de la forma específica de la región fotoblanqueada (reconstrucción 3D del alcance del láser de ablación en una célula) (Braga et al., 2004; Kuhn et al., 2011).

El conocimiento experimental de estas condiciones del sistema, permitió el desarrollo de una metodología de fotoblanqueo cuantitativo que considera las restricciones biológicas que impone la estructura del RE.

## **6.3. Diferencias del D en el RE dependientes del tamaño de la región evaluada**

Al aplicar esta metodología de microFRAP se observó de manera interesante que los valores en el D obtenidos mediante microFRAP presentan variaciones de hasta dos órdenes de magnitud menor, con respecto a los FRAPs en extensas regiones descrito en la literatura.

Utilizando la misma instrumentación aplicada en los microFRAP, se realizaron FRAP de regiones extensas con la finalidad de reproducir los valores de la literatura y descartar que las diferencias sean producto de la metodología microscópica y del análisis aplicado. Los experimentos de FRAP de regiones extensas arrojaron valores de D con una magnitud semejante a lo descrito en la literatura (Dayel et al., 1999). Sin embargo, los D obtenidos mediante microFRAP

fueron dos órdenes de magnitud menores, lo que no es esperable por cambiar solo la escala del FRAP. De acuerdo a esta diferencia, es posible especular que el transporte a través del RE posee al menos dos mecanismos de diferente. El más lento es el mecanismo de difusión simple que posee por su naturaleza de fluido. Sin embargo, el componente rápido puede deberse a transporte activo a través del RE, cambiando la velocidad media de las proteínas, debido a la aplicación de fuerzas externas ya sea por componentes del citoesqueleto o movimiento de membranas, como ya ha sido visualizado en células vegetales (Herman, 2008)

Por otra parte, es posible también que las proteínas posean una misma velocidad media y los cambios en la velocidad de recuperación sean debido a la movilidad de túbulos completos, en donde las proteínas contenidas en el interior del túbulo, serán transportadas a través de la célula por este mecanismo adicional. Ambas alternativas plantean nuevos mecanismos de transporte no descritos que podrían ser altamente relevantes en especial en transportes a largas distancias.

Tanto el transporte activo de proteínas a través del RE, como el transporte debido a la movilidad de túbulos completos, abordan las diferencias obtenidas en los microFRAPs, en comparación a los FRAP realizados en extensas regiones, estas dos interpretaciones se diferencian en la velocidad media que deben tener las moléculas individuales, para lo cual existen técnicas específicas que son capaces de evaluar la movilidad de moléculas individuales, por ejemplo *fluorescence correlation spectroscopy* (FCS) que representa una atractiva herramienta para aclarar este punto (Winckler et al., 2012) .

#### **6.4. Estructura de la célula y su relación con las variaciones en los D obtenidas por microFRAP.**

Uno de los datos inesperados obtenidos al realizar los experimentos de microFRAP fue la alta dispersión de los D obtenidos, alcanzando incluso dos órdenes de magnitud. Debido a este alto nivel de dispersión, se intentó identificar algún componente estructural que correlacionara con las diferencias encontradas, evaluando el D obtenido en los microFRAPs con diferentes parámetros que describen la estructura del RE.

Del mismo modo se evaluaron una serie de otras características estructurales: forma y tamaño de la célula, extensión de la red del RE, posición relativa donde se realizó la medición, desplazamiento de la región fotoblanqueada, y topología del microdominio, concluyendo que el transporte es independiente de todas estas características. Esto no explica las variaciones observadas en el D, pero sí establece que las variaciones estructurales evaluadas con estos parámetros no influyen en el D obtenido, lo que es especialmente importante en los experimentos posteriores ya que algunos de los tratamientos farmacológicos utilizados generan cambios estructurales sobre las células que ahora sabemos no afectarán D.

## 6.5. Dinámica estructural del RE; desafíos en el análisis cuantitativo de la movilidad subcelular: imágenes microscópicas

La evaluación cuantitativa de la dinámica subcelular en imágenes de microscopía ha sido un tema ampliamente abordado en estructuras discretas como vesículas o mitocondrias, en las que se han determinado una serie de parámetros como velocidad, distancia recorrida, o dirección (Gerencser and Nicholls, 2008).

La descripción cuantitativa de la dinámica estructural del RE posee mayor dificultad debido a la diversidad de movimientos de este organelo (ver Tabla 1), y al hecho de que es una única estructura continua, lo que dificulta clasificar cada tipo de movimiento, complicando su identificación y seguimiento. Hasta el momento, los análisis cuantitativos han sido restringidos a mediciones de elementos estáticos utilizando herramientas tales como análisis de esqueletonización, e interpretación de sus respectivos descriptores topológicos enfocados en identificar cambios en la longitud de los túbulos (Barbora Radochová, 2005; Puhka et al., 2012b; Puhka et al., 2007b; West et al., 2011a), su diámetro (West et al., 2011a) y en su patrón de ramificación (Puhka et al., 2007b; Wozniak et al., 2009). Sin embargo, esas metodologías requieren la segmentación de la imagen y en condiciones de alta frecuencia de adquisición estas poseen una baja intensidad de la señal y un alto ruido, lo que dificulta su aplicación.

Para abordar este problema fueron formuladas exitosamente metodologías que cuantifican la dinámica estructural del RE: autocorrelación basado en el análisis de *image correlation spectroscopy* (Rossow et al., 2010) y energía de movimiento (Heeger, 1988). Con estos métodos se generaron ID, describiendo la dinámica local

de una serie de imágenes, que al ser normalizado en función de tiempos anteriores genera un valor global del cambio en la dinámica estructural del RE.

Los ID obtenidos mediante autocorrelación y energía de movimiento fueron validados en diferentes aspectos: por una parte, en células vivas se evaluó la especificidad del movimiento mediante el uso de proteínas que deberían moverse más lento, brillar más, y por otra parte en simulaciones de RE dinámico, generadas para reproducir las características estructurales de las imágenes de RE de células COS-7 obtenidas en estos experimentos. En estos modelos se modificó progresivamente la dinámica estructural y se evaluó la respuesta lineal en modelos simulados de RE.

Realizando una validación profunda de estas nuevas herramientas se demostró la reproducibilidad y sensibilidad al movimiento en las condiciones experimentales utilizadas (aumento, frecuencia de adquisición, resolución espacial, razón señal-ruido etc.), estandarizando la cuantificación global y local de la dinámica de una red cerrada.

#### **6.6. Modificación del ID mediante alteración del citoesqueleto de MTs.**

Con el objetivo de modificar la dinámica estructural del RE cuantificada por el ID, se alteró uno de los principales componentes involucrados en la generación de movimientos al interior de la célula como lo es el citoesqueleto de MTs, mediante tratamientos farmacológicos que se sabe lo modifican.

Tanto Nocodazol y Taxol fueron efectivos en alterar la correcta polimerización de MTs, sin embargo, Taxol no modificó significativamente el ID. Este resultado es

de difícil interpretación, debido a que los efectos en la estabilización de los MTs mediante Taxol pueden tener efectos antagónicos sobre la dinámica estructural del RE, aumentando el movimiento corredizo mediado por motores moleculares, pero también aumentando las asociaciones estables de RE y MTs, por lo que, a pesar de ser un resultado decepcionante, está de acuerdo a lo esperado. Por otra parte, Nocodazol, produjo una disminución progresiva y gradual en el ID, lo cual satisface las expectativas del objetivo planteado, y permite seleccionar las condiciones de aplicación de este tratamiento que aseguren por una parte la disminución significativa del ID, y por otra parte que eviten la aparición de efectos inespecíficos producto de la exposición prolongada a una droga.

#### **6.7. Bioenergética y su relación con el D.**

Con la intención de demostrar que esta relación entre el ID y el D es un mecanismo activo reproducible bajo otras condiciones que modifiquen el ID, se evaluó como el agotamiento de ATP mediante la inhibición conjunta de la glicolisis y la fosforilación oxidativa pueden modificar el transporte. En principio se validó el tratamiento farmacológico mediante la cuantificación del consumo de oxígeno, y a continuación fue aplicado evaluando el D. Resultado de esto se observa una dramática disminución del D, lo que está de acuerdo a nuestra predicción y permite suponer una gran dependencia energética. Por otra parte, se observó una disminución en la fracción móvil, lo cual puede interpretarse como una disminución de la densidad de las moléculas, una disminución del volumen de la región evaluada

o una fragmentación de la estructura del RE, todas estas alternativas son escenarios inconvenientes ya que impiden obtener conclusiones directas.

#### **6.8. Relación entre la dinámica estructural y el transporte de proteínas; correlación entre ID y D.**

Se modificó el ID, lo que implica un cambio en la dinámica estructural del RE y se evaluó si existe correlación con el cambio en el transporte de proteínas, medido con el D a través de micro-FRAPs. Como resultado se observó que una disminución en el ID se correlaciona con una disminución en el D, lo que está de acuerdo con la hipótesis planteada, que relaciona la dinámica estructural del RE y el transporte por su interior. Esta correlación es limitada en su interpretación, debido a aspectos técnicos del tratamiento farmacológico, que además de modificar la dinámica estructural del RE modifican una serie de otros procesos subcelulares, por lo cual se requieren varias estrategias farmacológicas, sumado a herramientas genéticas, y mecánicas que sean capaces de modificar directamente las fuerzas implicadas en estos procesos, sumando una metodología independiente, para así dar cuenta inequívoca de la correlación propuesta. De ser corroborada esta relación, se complejizarán los modelos que explican el transporte de proteínas y el transporte de iones acoplado al posicionamiento de transportadores y proteínas asociadas.

## **6.9. Relevancia fisiológica en el transporte a grandes distancias.**

Nuevos mecanismos de regulación del transporte de proteínas a través de la célula pueden ser de gran relevancia en células de gran longitud y complejidad estructural como las neuronas. En este sentido, se acepta que el mecanismo principal de transporte en largas distancias es mediante vesículas que viajan a través del citoplasma. Sin embargo, evidencias sobre la distribución del RE en dendritas y axones, así como nuevas observaciones respecto a la relevancia del transporte a través de la continua red del RE neuronal permiten hoy proponer mecanismos alternativos de distribución de proteínas (Gonzalez and Couve, 2014; González, 2016; Horton and Ehlers, 2003; Valenzuela et al., 2014). Por este motivo un mecanismo activo de transporte a través del RE abre nuevas perspectivas sobre el impacto de este tipo de transporte y la relevancia que pueda tener en el tráfico células de gran tamaño y altamente polarizadas como las neuronas.

Siendo el RE altamente compacto en términos de la proximidad de sus microdominios, túbulos y cisternas, en la mayoría de los modelos celulares, no es siempre posible realizar microFRAPs sobre un único microdominio estructural como se realizó en las células COS-7. Por este motivo para el estudio en profundidad de RE en otros modelos como neuronas, se requiere de la implementación de técnicas de superresolución que permitan por una parte describir su estructura, y por otra parte el transporte, siendo el seguimiento de moléculas individuales y la obtención de velocidades medias una alternativa ideal.

Sin embargo, debido a su complicación técnica y equipamiento especializado, las técnicas de superresolución han sido aplicadas escasamente en

la cuantificación de proteínas reticulares y restringiéndose únicamente a proteínas de RE en la membrana. Describiendo una gran variabilidad en el D en hasta dos órdenes de magnitud para la misma condición, identificando zonas segregadas que poseen D altos excluidos de las zonas donde se encuentran los D de menor magnitud lo cual se sospecha es resultado de la composición lipídica del RE, y siendo utilizado también para reproducir valores obtenidos mediante FRAP (Anderluh et al., 2014; Smith et al., 2014; Wu et al., 2014). Por lo que la introducción de nuevos métodos de cuantificación del transporte de proteínas en el RE, y de la dinámica estructural de este organelo, permitirán profundizar en la relevancia de estas propiedades en la fisiología celular.

## 7.-CONCLUSIONES

- microFRAPs de túbulos individuales de RE son una técnica efectiva en la descripción del transporte de proteínas en microdominios del RE mediante el coeficiente de difusión D.
- El D evaluado en microdominios no depende de características estructurales del RE o de la célula.
- El ID mediante autocorrelación y energía de movimiento es una herramienta efectiva en la cuantificación de la dinámica estructural del RE, simulado y bajo ciertas condiciones farmacológicas que afectan la movilidad del RE.
- Una célula control posee un ID constante en el rango de una hora.
- La alteración de la estabilidad del citoesqueleto de MTs correlaciona con cambios en el ID.
- La evaluación conjunta del ID y del D mediante microFRAPs son una herramienta eficiente en la identificación de correlaciones entre estos eventos de movilidad celular
- ID y D correlacionan al modificar el citoesqueleto de MTs.

## 8. - REFERENCIAS

- Ajduk, A., T. Ilozue, S. Windsor, Y. Yu, K.B. Seres, R.J. Bomphrey, B.D. Tom, K. Swann, A. Thomas, C. Graham, and M. Zernicka-Goetz. 2011. Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability. *Nature communications*. 2:417.
- Alcayaga, L. 2012. GENERACION DE SKELETONS A PARTIR DE MALLAS DE SUPERFICIE. Vol. Ingenieria Civil en Computación. Universidad de Chile.
- Allan, V. 1995. Protein phosphatase 1 regulates the cytoplasmic dynein-driven formation of endoplasmic reticulum networks in vitro. *The Journal of cell biology*. 128:879-891.
- Anderluh, A., E. Klotzsch, J. Ries, A.W. Reismann, S. Weber, M. Folser, F. Koban, M. Freissmuth, H.H. Sitte, and G.J. Schutz. 2014. Tracking single serotonin transporter molecules at the endoplasmic reticulum and plasma membrane. *Biophysical journal*. 106:L33-35.
- Anderson, D.J., and M.W. Hetzer. 2008. Reshaping of the endoplasmic reticulum limits the rate for nuclear envelope formation. *The Journal of cell biology*. 182:911-924.
- Andrade, J., H. Zhao, B. Titus, S. Timm Pearce, and M. Barroso. 2004. The EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding protein p22 plays a role in microtubule and endoplasmic reticulum organization and dynamics with distinct Ca<sup>2+</sup>-binding requirements. *Molecular biology of the cell*. 15:481-496.
- Axelrod, D., D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W.W. Webb. 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical journal*. 16:1055-1069.
- Bannai, H., T. Inoue, T. Nakayama, M. Hattori, and K. Mikoshiba. 2004. Kinesin dependent, rapid, bi-directional transport of ER sub-compartment in dendrites of hippocampal neurons. *Journal of cell science*. 117:163-175.
- Barbora Radochová, J.J., Kateřina Schwarzerová, Erna Demjénová, Zoltán Tomori, Petr Karen, Lucie Kubínová. 2005. Analysis of endoplasmic reticulum of tobacco cells using confocal microscopy. *Image Anal Stereol*. 24:181-185.
- Baumann, O., and B. Walz. 2001. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *International review of cytology*. 205:149-214.
- Booth-Gauthier, E.A., T.A. Alcoser, G. Yang, and K.N. Dahl. 2012. Force-induced changes in subnuclear movement and rheology. *Biophysical journal*. 103:2423-2431.
- Boučekhima, A.N., L. Frigerio, and M. Kirkilionis. 2009. Geometric quantification of the plant endoplasmic reticulum. *Journal of microscopy*. 234:158-172.
- Bradke, F., and C.G. Dotti. 1997. Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron*. 19:1175-1186.
- Braga, J., J.M. Desterro, and M. Carmo-Fonseca. 2004. Intracellular macromolecular mobility measured by fluorescence recovery after photobleaching with confocal laser scanning microscopes. *Molecular biology of the cell*. 15:4749-4760.
- Bridgman, P.C. 1999. Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. *The Journal of cell biology*. 146:1045-1060.
- Brown, R. 1828. On the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Edinburgh New Philosophical Journal*:358 – 371.
- Castaneda, V., M. Cerda, F. Santibanez, J. Jara, E. Pulgar, K. Palma, C.G. Lemus, M. Osorio-Reich, M.L. Concha, and S. Hartel. 2014. Computational methods for analysis of dynamic events in cell migration. *Current molecular medicine*. 14:291-307.

- Costantini, L., and E. Snapp. 2013. Probing endoplasmic reticulum dynamics using fluorescence imaging and photobleaching techniques. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*. 60:Unit 21 27.
- Couve, A., S.J. Moss, and M.N. Pangalos. 2000. GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci*. 16:296-312.
- Cui-Wang, T., C. Hanus, T. Cui, T. Helton, J. Bourne, D. Watson, K.M. Harris, and M.D. Ehlers. 2012. Local zones of endoplasmic reticulum complexity confine cargo in neuronal dendrites. *Cell*. 148:309-321.
- Chao, J.T., A.K. Wong, S. Tavassoli, B.P. Young, A. Chruscicki, N.N. Fang, L.J. Howe, T. Mayor, L.J. Foster, and C.J. Loewen. 2014. Polarization of the endoplasmic reticulum by ER-septin tethering. *Cell*. 158:620-632.
- Chen, S., P. Novick, and S. Ferro-Novick. 2012. ER network formation requires a balance of the dynamin-like GTPase Sey1p and the Lunapark family member Lnp1p. *Nature cell biology*. 14:707-716.
- Dabora, S.L., and M.P. Sheetz. 1988. The microtubule-dependent formation of a tubulovesicular network with characteristics of the ER from cultured cell extracts. *Cell*. 54:27-35.
- Dawson, T.R., M.D. Lazarus, M.W. Hetzer, and S.R. Wenthe. 2009. ER membrane-bending proteins are necessary for de novo nuclear pore formation. *The Journal of cell biology*. 184:659-675.
- Dayel, M.J., E.F. Hom, and A.S. Verkman. 1999. Diffusion of green fluorescent protein in the aqueous-phase lumen of endoplasmic reticulum. *Biophysical journal*. 76:2843-2851.
- Dekker-Ohno, K., S. Hayasaka, Y. Takagishi, S. Oda, N. Wakasugi, K. Mikoshiba, M. Inouye, and H. Yamamura. 1996. Endoplasmic reticulum is missing in dendritic spines of Purkinje cells of the ataxic mutant rat. *Brain research*. 714:226-230.
- Dreier, L., and T.A. Rapoport. 2000. In vitro formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction. *The Journal of cell biology*. 148:883-898.
- Einstein, A. 1905. Investigations on the theory of the Brownian movement. *Annalen der Physik*:549 - 560.
- Elowitz, M.B., M.G. Surette, P.E. Wolf, J.B. Stock, and S. Leibler. 1999. Protein mobility in the cytoplasm of Escherichia coli. *Journal of bacteriology*. 181:197-203.
- Enderlein, J., I. Gregor, D. Patra, and J. Fitter. 2005. Statistical analysis of diffusion coefficient determination by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of fluorescence*. 15:415-422.
- English, A.R., and G.K. Voeltz. 2013a. Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5:a013227.
- English, A.R., and G.K. Voeltz. 2013b. Rab10 GTPase regulates ER dynamics and morphology. *Nature cell biology*. 15:169-178.
- Fang, M., Z. Shen, S. Huang, L. Zhao, S. Chen, T.W. Mak, and X. Wang. 2010. The ER UDPase ENTPD5 promotes protein N-glycosylation, the Warburg effect, and proliferation in the PTEN pathway. *Cell*. 143:711-724.
- Federovitch, C.M., D. Ron, and R.Y. Hampton. 2005. The dynamic ER: experimental approaches and current questions. *Current opinion in cell biology*. 17:409-414.
- Fehrenbacher, K.L., D. Davis, M. Wu, I. Boldogh, and L.A. Pon. 2002. Endoplasmic reticulum dynamics, inheritance, and cytoskeletal interactions in budding yeast. *Molecular biology of the cell*. 13:854-865.
- FitzHarris, G., P. Marangos, and J. Carroll. 2007. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Developmental biology*. 305:133-144.

- Fletcher, D.A., and R.D. Mullins. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 463:485-492.
- Friedman, J.R., L.L. Lackner, M. West, J.R. DiBenedetto, J. Nunnari, and G.K. Voeltz. 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*. 334:358-362.
- Friedman, J.R., and G.K. Voeltz. 2011. The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends in cell biology*. 21:709-717.
- Friedman, J.R., B.M. Webster, D.N. Mastronarde, K.J. Verhey, and G.K. Voeltz. 2010a. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *The Journal of cell biology*. 190:363-375.
- Friedman, J.R., B.M. Webster, D.N. Mastronarde, K.J. Verhey, and G.K. Voeltz. 2010b. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *Journal of Cell Biology*. 190:363-375.
- Galan, C., N. Dionisio, T. Smani, G.M. Salido, and J.A. Rosado. 2011. The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca<sup>2+</sup> channel subunits Orai1 and TRPC1. *Biochem Pharmacol*. 82:400-410.
- García-Pérez, A.I., E.A. López-Beltrán, P. Kluner, J. Luque, P. Ballesteros, and S. Cerdán. 1999. Molecular crowding and viscosity as determinants of translational diffusion of metabolites in subcellular organelles. *Archives of biochemistry and biophysics*. 362:329-338.
- Gerencser, A.A., and D.G. Nicholls. 2008. Measurement of instantaneous velocity vectors of organelle transport: mitochondrial transport and bioenergetics in hippocampal neurons. *Biophysical journal*. 95:3079-3099.
- Goldstein, R.E., I. Tuval, and J.W. van de Meent. 2008. Microfluidics of cytoplasmic streaming and its implications for intracellular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:3663-3667.
- Gonzalez, C., and A. Couve. 2014. The axonal endoplasmic reticulum and protein trafficking: Cellular bootlegging south of the soma. *Seminars in cell & developmental biology*. 27:23-31.
- González, J.C., Javiere Fresno, Eduardo Couve, Felipe A. Court, and Andrés Couve. 2016. Axons provide the secretory machinery for trafficking of voltage-gated sodium channels in peripheral nerve. *PNAS*. in press.
- Graf, R., J. Rietdorf, and T. Zimmermann. 2005. Live cell spinning disk microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 95:57-75.
- Grigoriev, I., S.M. Gouveia, B. van der Vaart, J. Demmers, J.T. Smyth, S. Honnappa, D. Splinter, M.O. Steinmetz, J.W. Putney, Jr., C.C. Hoogenraad, and A. Akhmanova. 2008. STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Current biology : CB*. 18:177-182.
- Hawes, C., A. Osterrieder, I.A. Sparkes, and T. Ketelaar. 2010. Optical tweezers for the micromanipulation of plant cytoplasm and organelles. *Current opinion in plant biology*. 13:731-735.
- Heeger, D. 1988. Optical flow using spatiotemporal filters. *International Journal of Computer Vision*. 1:279-302.
- Herman, E.M. 2008. Endoplasmic reticulum bodies: solving the insoluble. *Current opinion in plant biology*. 11:672-679.
- Horton, A.C., and M.D. Ehlers. 2003. Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 23:6188-6199.
- Hoth, M., and R. Penner. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. 355:353-356.
- Hu, J., Y. Shibata, P.P. Zhu, C. Voss, N. Rismanchi, W.A. Prinz, T.A. Rapoport, and C. Blackstone. 2009. A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell*. 138:549-561.

- Joensuu, M., I. Belevich, O. Ramo, I. Nevzorov, H. Vihinen, M. Puhka, T.M. Witkos, M. Lowe, M.K. Vartiainen, and E. Jokitalo. 2014. ER sheet persistence is coupled to myosin 1c-regulated dynamic actin filament arrays. *Molecular biology of the cell*. 25:1111-1126.
- Kirchhoff, H., C. Hall, M. Wood, M. Herbstova, O. Tsabari, R. Nevo, D. Charuvi, E. Shimoni, and Z. Reich. 2011. Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:20248-20253.
- Kiseleva, E., K.N. Morozova, G.K. Voeltz, T.D. Allen, and M.W. Goldberg. 2007. Reticulon 4a/NogoA locates to regions of high membrane curvature and may have a role in nuclear envelope growth. *Journal of structural biology*. 160:224-235.
- Klopfenstein, D.R., F. Kappeler, and H.P. Hauri. 1998. A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *The EMBO journal*. 17:6168-6177.
- Klopfenstein, D.R., J. Klumperman, A. Lustig, R.A. Kammerer, V. Oorschot, and H.P. Hauri. 2001. Subdomain-specific localization of CLIMP-63 (p63) in the endoplasmic reticulum is mediated by its luminal alpha-helical segment. *The Journal of cell biology*. 153:1287-1300.
- Kohler, R.H., P. Schwille, W.W. Webb, and M.R. Hanson. 2000. Active protein transport through plastid tubules: velocity quantified by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of cell science*. 113 ( Pt 22):3921-3930.
- Koppel, D.E., D. Axelrod, J. Schlessinger, E.L. Elson, and W.W. Webb. 1976. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophysical journal*. 16:1315-1329.
- Kucharz, K., T. Wieloch, and H. Toresson. 2011a. Potassium-Induced Structural Changes of the Endoplasmic Reticulum in Pyramidal Neurons in Murine Organotypic Hippocampal Slices. *J Neurosci Res*. 89:1150-1159.
- Kucharz, K., T. Wieloch, and H. Toresson. 2011b. Rapid fragmentation of the endoplasmic reticulum in cortical neurons of the mouse brain in situ following cardiac arrest. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 31:1663-1667.
- Kuhn, T., T.O. Ihalainen, J. Hyvaluoma, N. Dross, S.F. Willman, J. Langowski, M. Vihinen-Ranta, and J. Timonen. 2011. Protein diffusion in mammalian cell cytoplasm. *PLoS one*. 6:e22962.
- Lai, C.W., D.E. Aronson, and E.L. Snapp. 2010. BiP availability distinguishes states of homeostasis and stress in the endoplasmic reticulum of living cells. *Molecular biology of the cell*. 21:1909-1921.
- Langford, G.M. 1999. ER transport on actin filaments in squid giant axon: implications for signal transduction at synapse. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 13 Suppl 2:S248-250.
- Lee, C., and L.B. Chen. 1988. Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell*. 54:37-46.
- Lin, C., Y. Zhang, I. Sparkes, and P. Ashwin. 2014. Structure and dynamics of ER: minimal networks and biophysical constraints. *Biophysical journal*. 107:763-772.
- Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp, and A. Kenworthy. 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:444-456.
- Lu, L., M.S. Ladinsky, and T. Kirchhausen. 2011. Formation of the postmitotic nuclear envelope from extended ER cisternae precedes nuclear pore assembly. *The Journal of cell biology*. 194:425-440.
- Mackintosh, F.C. 2012. Active diffusion: the erratic dance of chromosomal loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:7138-7139.
- Marriott, I., and M.J. Mason. 1995. ATP depletion inhibits capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in rat thymic lymphocytes. *The American journal of physiology*. 269:C766-774.

- Miyawaki, A. 2011. Proteins on the move: insights gained from fluorescent protein technologies. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 12:656-668.
- Nikonov, A.V., and G. Kreibich. 2003. Organization of translocon complexes in ER membranes. *Biochemical Society transactions*. 31:1253-1256.
- Niwayama, R., K. Shinohara, and A. Kimura. 2011. Hydrodynamic property of the cytoplasm is sufficient to mediate cytoplasmic streaming in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:11900-11905.
- Nogales, E. 2000. Structural insights into microtubule function. *Annual review of biochemistry*. 69:277-302.
- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, T. Ueno, T. Kurata, T. Sata, and S. Irie. 2007. p180 is involved in the interaction between the endoplasmic reticulum and microtubules through a novel microtubule-binding and bundling domain. *Molecular biology of the cell*. 18:3741-3751.
- Olveczky, B.P., and A.S. Verkman. 1998. Monte Carlo analysis of obstructed diffusion in three dimensions: application to molecular diffusion in organelles. *Biophysical journal*. 74:2722-2730.
- Opazo, F., A. Punge, J. Buckers, P. Hoopmann, L. Kastrup, S.W. Hell, and S.O. Rizzoli. 2010. Limited intermixing of synaptic vesicle components upon vesicle recycling. *Traffic*. 11:800-812.
- Orso, G., D. Pendin, S. Liu, J. Toso, T.J. Moss, J.E. Faust, M. Micaroni, A. Egorova, A. Martinuzzi, J.A. McNew, and A. Daga. 2009. Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin. *Nature*. 460:978-983.
- Palade, G.E., and K.R. Porter. 1954. Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells in situ. *The Journal of experimental medicine*. 100:641-656.
- Park, S.H., and C. Blackstone. 2010. Further assembly required: construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. *EMBO reports*. 11:515-521.
- Park, S.H., P.P. Zhu, R.L. Parker, and C. Blackstone. 2010. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *The Journal of clinical investigation*. 120:1097-1110.
- Partikian, A., B. Olveczky, R. Swaminathan, Y. Li, and A.S. Verkman. 1998. Rapid diffusion of green fluorescent protein in the mitochondrial matrix. *The Journal of cell biology*. 140:821-829.
- Pendin, D., J.A. McNew, and A. Daga. 2011. Balancing ER dynamics: shaping, bending, severing, and mending membranes. *Current opinion in cell biology*. 23:435-442.
- Porter, K.R., A. Claude, and E.F. Fullam. 1945. A Study of Tissue Culture Cells by Electron Microscopy : Methods and Preliminary Observations. *The Journal of experimental medicine*. 81:233-246.
- Presley, J.F. 2005. Imaging the secretory pathway: the past and future impact of live cell optical techniques. *Biochimica et biophysica acta*. 1744:259-272.
- Prinz, W.A., L. Grzyb, M. Veenhuis, J.A. Kahana, P.A. Silver, and T.A. Rapoport. 2000. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*. 150:461-474.
- Puhka, M., M. Joensuu, H. Vihinen, I. Belevich, and E. Jokitalo. 2012a. Progressive sheet-to-tubule transformation is a general mechanism for endoplasmic reticulum partitioning in dividing mammalian cells. *Molecular biology of the cell*. 23:2424-2432.
- Puhka, M., M. Joensuu, H. Vihinen, I. Belevich, and E. Jokitalo. 2012b. Progressive sheet-to-tubule transformation is a general mechanism for endoplasmic reticulum partitioning in dividing mammalian cells. *Molecular biology of the cell*. 23:2424-2432.
- Puhka, M., H. Vihinen, M. Joensuu, and E. Jokitalo. 2007a. Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*. 179:895-909.

- Puhka, M., H. Vihinen, M. Joensuu, and E. Jokitalo. 2007b. Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 179:895-909.
- Rossow, M.J., J.M. Sasaki, M.A. Digman, and E. Gratton. 2010. Raster image correlation spectroscopy in live cells. *Nature protocols*. 5:1761-1774.
- Runions, J., T. Brach, S. Kuhner, and C. Hawes. 2006. Photoactivation of GFP reveals protein dynamics within the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of experimental botany*. 57:43-50.
- Sandefur, C.I., and S. Schnell. 2011. A model of threshold behavior reveals rescue mechanisms of bystander proteins in conformational diseases. *Biophysical journal*. 100:1864-1873.
- Sbalzarini, I.F., A. Mezzacasa, A. Helenius, and P. Koumoutsakos. 2005. Effects of organelle shape on fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical journal*. 89:1482-1492.
- Schweizer, A., J. Rohrer, J.W. Slot, H.J. Geuze, and S. Kornfeld. 1995. Reassessment of the subcellular localization of p63. *Journal of cell science*. 108 ( Pt 6):2477-2485.
- Serbus, L.R., B.J. Cha, W.E. Theurkauf, and W.M. Saxton. 2005. Dynein and the actin cytoskeleton control kinesin-driven cytoplasmic streaming in *Drosophila* oocytes. *Development*. 132:3743-3752.
- Shaner, N.C., G.G. Lambert, A. Chammas, Y. Ni, P.J. Cranfill, M.A. Baird, B.R. Sell, J.R. Allen, R.N. Day, M. Israelsson, M.W. Davidson, and J. Wang. 2013. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nature methods*. 10:407-409.
- Shemesh, T., R.W. Klemm, F.B. Romano, S. Wang, J. Vaughan, X. Zhuang, H. Tukachinsky, M.M. Kozlov, and T.A. Rapoport. 2014. A model for the generation and interconversion of ER morphologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:E5243-5251.
- Shibata, Y., T. Shemesh, W.A. Prinz, A.F. Palazzo, M.M. Kozlov, and T.A. Rapoport. 2010. Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell*. 143:774-788.
- Shibata, Y., G.K. Voeltz, and T.A. Rapoport. 2006. Rough sheets and smooth tubules. *Cell*. 126:435-439.
- Shibata, Y., C. Voss, J.M. Rist, J. Hu, T.A. Rapoport, W.A. Prinz, and G.K. Voeltz. 2008. The reticulon and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. 283:18892-18904.
- Simon, S.M., C.S. Peskin, and G.F. Oster. 1992. What drives the translocation of proteins? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:3770-3774.
- Smith, I.F., D. Swaminathan, G.D. Dickinson, and I. Parker. 2014. Single-molecule tracking of inositol trisphosphate receptors reveals different motilities and distributions. *Biophysical journal*. 107:834-845.
- Snapp, E.L. 2009. Fluorescent proteins: a cell biologist's user guide. *Trends in cell biology*. 19:649-655.
- Snapp, E.L., N. Altan, and J. Lippincott-Schwartz. 2003a. Measuring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*. Chapter 21:Unit 21 21.
- Snapp, E.L., R.S. Hegde, M. Francolini, F. Lombardo, S. Colombo, E. Pedrazzini, N. Borgese, and J. Lippincott-Schwartz. 2003b. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *The Journal of cell biology*. 163:257-269.
- Soboloff, J., B.S. Rothberg, M. Madesh, and D.L. Gill. 2012. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 13:549-565.

- Sparkes, I., J. Runions, C. Hawes, and L. Griffing. 2009a. Movement and remodeling of the endoplasmic reticulum in nondividing cells of tobacco leaves. *The Plant cell*. 21:3937-3949.
- Sparkes, I.A., T. Ketelaar, N.C. de Ruijter, and C. Hawes. 2009b. Grab a Golgi: laser trapping of Golgi bodies reveals in vivo interactions with the endoplasmic reticulum. *Traffic*. 10:567-571.
- Speese, S.D., J. Ashley, V. Jokhi, J. Nunnari, R. Barria, Y. Li, B. Ataman, A. Koon, Y.T. Chang, Q. Li, M.J. Moore, and V. Budnik. 2012. Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling. *Cell*. 149:832-846.
- Stefano, G., L. Renna, and F. Brandizzi. 2014. The endoplasmic reticulum exerts control over organelle streaming during cell expansion. *Journal of cell science*. 127:947-953.
- Subramanian, K., and T. Meyer. 1997. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell*. 89:963-971.
- Swaminathan, R., C.P. Hoang, and A.S. Verkman. 1997. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical journal*. 72:1900-1907.
- Tabb, J.S., B.J. Molyneaux, D.L. Cohen, S.A. Kuznetsov, and G.M. Langford. 1998. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *Journal of cell science*. 111 ( Pt 21):3221-3234.
- Takagishi, Y., S. Oda, S. Hayasaka, K. Dekker-Ohno, T. Shikata, M. Inouye, and H. Yamamura. 1996. The dilute-lethal (dl) gene attacks a Ca<sup>2+</sup> store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neuroscience letters*. 215:169-172.
- Tanaka, Y., Y. Kanai, Y. Okada, S. Nonaka, S. Takeda, A. Harada, and N. Hirokawa. 1998. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell*. 93:1147-1158.
- Terasaki, M. 1990. Recent progress on structural interactions of the endoplasmic reticulum. *Cell motility and the cytoskeleton*. 15:71-75.
- Terasaki, M. 2000. Dynamics of the endoplasmic reticulum and golgi apparatus during early sea urchin development. *Molecular biology of the cell*. 11:897-914.
- Terasaki, M., L.B. Chen, and K. Fujiwara. 1986. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *The Journal of cell biology*. 103:1557-1568.
- Terasaki, M., and T.S. Reese. 1994. Interactions among endoplasmic reticulum, microtubules, and retrograde movements of the cell surface. *Cell motility and the cytoskeleton*. 29:291-300.
- Terasaki, M., T. Shemesh, N. Kasthuri, R.W. Klemm, R. Schalek, K.J. Hayworth, A.R. Hand, M. Yankova, G. Huber, J.W. Lichtman, T.A. Rapoport, and M.M. Kozlov. 2013. Stacked endoplasmic reticulum sheets are connected by helical membrane motifs. *Cell*. 154:285-296.
- Tseng, Y., T.P. Kole, and D. Wirtz. 2002. Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology. *Biophysical journal*. 83:3162-3176.
- Ueda, H., E. Yokota, N. Kutsuna, T. Shimada, K. Tamura, T. Shimmen, S. Hasezawa, V.V. Dolja, and I. Hara-Nishimura. 2010. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:6894-6899.
- Valenzuela, J.I., M. Jauregui-Bravo, D.A. Salas, O.A. Ramirez, V.H. Cornejo, H.E. Lu, T.A. Blanpied, and A. Couve. 2014. Transport along the dendritic endoplasmic reticulum mediates the trafficking of GABAB receptors. *Journal of cell science*. 127:3382-3395.
- Vedrenne, C., and H.P. Hauri. 2006. Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion. *Traffic*. 7:639-646.

- Verchot-Lubicz, J., and R.E. Goldstein. 2010. Cytoplasmic streaming enables the distribution of molecules and vesicles in large plant cells. *Protoplasma*. 240:99-107.
- Vincent, M., M. Whidden, and S. Schnell. 2014. Surveying the floodgates: estimating protein flux into the endoplasmic reticulum lumen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in physiology*. 5:444.
- Vishnu, N., M. Jadoon Khan, F. Karsten, L.N. Groschner, M. Waldeck-Weiermair, R. Rost, S. Hallstrom, H. Imamura, W.F. Graier, and R. Malli. 2014. ATP increases within the lumen of the endoplasmic reticulum upon intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Molecular biology of the cell*. 25:368-379.
- Voeltz, G.K., W.A. Prinz, Y. Shibata, J.M. Rist, and T.A. Rapoport. 2006. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*. 124:573-586.
- Vyshenskaya, T.V., V.P. Tychinsky, D.G. Weiss, and S.A. Kuznetsov. 2014. Dynamic phase microscopy reveals periodic oscillations of endoplasmic reticulum during network formation. *Biochemistry. Biokhimiia*. 79:907-916.
- Waterman-Storer, C.M., A. Desai, J.C. Bulinski, and E.D. Salmon. 1998. Fluorescent speckle microscopy, a method to visualize the dynamics of protein assemblies in living cells. *Current biology : CB*. 8:1227-1230.
- Waterman-Storer, C.M., J. Gregory, S.F. Parsons, and E.D. Salmon. 1995. Membrane/microtubule tip attachment complexes (TACs) allow the assembly dynamics of plus ends to push and pull membranes into tubulovesicular networks in interphase *Xenopus* egg extracts. *The Journal of cell biology*. 130:1161-1169.
- Waterman-Storer, C.M., and E.D. Salmon. 1998. Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Current biology : CB*. 8:798-806.
- Weihls, D., T.G. Mason, and M.A. Teitell. 2006. Bio-microrheology: a frontier in microrheology. *Biophysical journal*. 91:4296-4305.
- West, M., N. Zurek, A. Hoenger, and G.K. Voeltz. 2011a. A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *The Journal of cell biology*. 193:333-346.
- West, M., N. Zurek, A. Hoenger, and G.K. Voeltz. 2011b. A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *Journal of Cell Biology*. 193:333-346.
- Westrate, L.M., J.E. Lee, W.A. Prinz, and G.K. Voeltz. 2015. Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annual review of biochemistry*. 84:791-811.
- Wickner, W., and R. Schekman. 2005. Protein translocation across biological membranes. *Science*. 310:1452-1456.
- Winckler, P., A. Cailler, R. Deturche, P. Jeannesson, H. Morjani, and R. Jaffiol. 2012. Microfluidity mapping using fluorescence correlation spectroscopy: a new way to investigate plasma membrane microorganization of living cells. *Biochimica et biophysica acta*. 1818:2477-2485.
- Wirtz, D. 2009. Particle-tracking microrheology of living cells: principles and applications. *Annual review of biophysics*. 38:301-326.
- Wozniak, M.J., B. Bola, K. Brownhill, Y.C. Yang, V. Levakova, and V.J. Allan. 2009. Role of kinesin-1 and cytoplasmic dynein in endoplasmic reticulum movement in VERO cells. *Journal of cell science*. 122:1979-1989.
- Wright, B.D., M. Terasaki, and J.M. Scholey. 1993. Roles of kinesin and kinesin-like proteins in sea urchin embryonic cell division: evaluation using antibody microinjection. *The Journal of cell biology*. 123:681-689.

Wu, M.M., E.D. Covington, and R.S. Lewis. 2014. Single-molecule analysis of diffusion and trapping of STIM1 and Orai1 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Molecular biology of the cell*. 25:3672-3685.

## 9. - ANEXO

### 9.1.- Premios

- **2do Premio: Mejor Imagen en Biología Celular 2014**, Chilean Society for Cell Biology, octubre 2014.
- **1do Premio: Mejor Imagen En concurso de imágenes Micro-Macro** enmarcado en el "Séptimo Encuentro de Jóvenes Investigadores en Neurociencias", en Córdoba, Argentina Julio 2015
- **2do Premio: Mejor Imagen en Biología Celular 2014**, Chilean Society for Cell Biology, octubre 2015.
- **Best Project award. Training course "Processing and Analysis of Fluorescence Microscopy Images"**; Institute Pasteur, Montevideo, Uruguay, Marzo 2016.

### 9.2. - Publicaciones generadas

- Mauricio Cerda, Jorge Toledo, Steffen Härtel. Geometrical constraints to improve elongated structures segmentation applied to actin filaments. VI Conference CCPR 2014.

### 9.3. - Congresos

- **A computational study of methods for estimating diffusion coefficient in frap experiments.** Luis Briones, Mauricio Cerda, Jorge Toledo, Omar Ramirez, Takeshi Asahi, Andres Couve, and Steffen Härtel. CHILEAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY XXVI ANNUAL MEETING. Puerto Varas, Octubre 23-27 del 2012.
- **Optical flow for motion estimation and tracking of subcellular, cellular and supracellular dynamics.** Mauricio Cerda, Jorge Jara, Alex Córdova, Jorge Toledo, Eduardo Pulgar, Carmen-Gloria Lemus, Omar Ramírez, Jarno Ralli, Miguel Concha, Steffen Härtel. CHILEAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY XXVI ANNUAL MEETING. Puerto Varas, Octubre 23-27 del 2012.
- **Endoplasmic reticulum organization and modulation of calcium signals in astrocytes.** Omar Ramirez, Alex Córdova, Jorge Toledo, Mauricio Cerda, Andrés Couve, Steffen Härtel. CHILEAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY XXVI ANNUAL MEETING. Puerto Varas, Octubre 23-27 del 2012.
- **The organization of the tubular network of the endoplasmic reticulum modifies the transport of cargo proteins.** Jorge Toledo, Luis Briones, Mauricio Cerda, Jorge Jara, Steffen Härtel, Omar Ramírez, and Andrés Couve. CHILEAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY XXVI ANNUAL MEETING. Puerto Varas, 23 al 27 de Octubre del 2012.
- **Spatiotemporal cartography of the endoplasmic reticulum dynamic.** Jorge Toledo, Pamela Romero, Mauricio Cerda, Felipe Santibáñez, Nicolás Navarro, Juan José Sáez, Andrés Couve, Steffen Härtel. EMBO Workshop:

Current advances in membrane trafficking: Implications for polarity and diseases. Puerto Natales, Chile, 9 al 14 de septiembre, 2014.

- **Structural dynamics of the endoplasmic reticulum and its relation to luminal protein transport.** Jorge Toledo, Nicolás Navarro, Pamela Romero, Félix Urra, Mauricio Cerda., Felipe Santibáñez, Omar Ramírez, Steffen Härtel, Andrés Couve. CHILEAN SOCIETY FOR CELLBIOLOGY XXVIII ANNUAL MEETING. Puerto Varas, Octubre 26-30, 2014.
- **Complex I inhibition produces metabolic remodeling and decreases migration in breast cancer cells: Role of glucose availability.** Félix A. Urra, Felipe Muñoz-Córdova, Jorge Toledo, Ramiro Araya-Maturana, César Cárdenas. CHILEAN SOCIETY FOR CELLBIOLOGY XXVIII ANNUAL MEETING. Puerto Varas, 26 al 30 de octubre, 2014.
- **Structural dynamics of the endoplasmic reticulum and its relation to luminal protein transport.** Jorge Toledo, Mauricio Cerda, Felipe Santibáñez, Pamela Romero, Nicolás Navarro, Félix A Urra, Omar Ramírez, Christian Gonzalez-Billault, Steffen Hartel, Andrés Couve. Conference on Quantitative Biolmaging in Paris, Francia. Enero 7-9, 2015.
- **Structural dynamics of the endoplasmic reticulum mediated by cytoskeleton modifies luminal protein transport.** Jorge Toledo, Mauricio Cerda, Felipe Santibáñez, Félix Urra, Claudia Reyes, Daniela Flores, Javiera Bruna, Cesar Cárdenas, Steffen Härtel, Andrés Couve. Tsukuba Global Science Week (TGSW), Tsukuba, Japón. Septiembre 28-30, 2015.
- **Trafficking of voltage-gated sodium channels in peripheral injured axons.** Macarena Díaz-Ubilla, Carolina González, Jorge Toledo, José Cánovas, Tomás Aguirre, Felipe Court, and Andrés Couve. CHILEAN SOCIETY FOR CELLBIOLOGY XXIX ANNUAL MEETING, Puerto Varas, Octubre 25-29, 2015.
- **Targeted epigenetic editing to control PSD95 gene expression and to regulate neuronal refinement.** Nur Jury, Fernando Bustos, Estibaliz Ampuero, Rodrigo Aguilar, Lorena Varela-Nallar, Fahimeh Dalái, Jorge Toledo, Juan Ahumada, Berta Henríquez, Miguel Guerra, Jimmy Stehberg, Rachael Neve, Marco Fuenzalida, Steffen Härtel, Marianne Rots, Martín Montecino, Brigitte van Zundert. CHILEAN SOCIETY FOR CELLBIOLOGY XXIX ANNUAL MEETING, Puerto Varas, Octubre 25-29, 2015.
- **Thy-1-induced migration requires  $\beta$ 3-Integrin expression in astrocytes.** Raúl Lagos Cabré, Álvaro Álvarez, Milene Kong, Francesca Burgos, Jorge Toledo, Steffen Härtel, Andrew F.G. Quest, Lisette Leyton. CHILEAN SOCIETY FOR CELLBIOLOGY XXIX ANNUAL MEETING, Puerto Varas, Octubre 25-29, 2015.
- **A virtual microscope for school education: the MicroMundo project.** Claudia Reyes, Camilo Allende-Castro, Daniela Flores, Macarena Díaz, Francisca Valdés, Patricio Núñez, Alejandro Frutos, Eugenia Díaz, Alejandra García, Steffen Härtel, Jorge Toledo. CHILEAN SOCIETY FOR CELLBIOLOGY XXIX ANNUAL MEETING, Puerto Varas, Octubre 25-29, 2015.

- **Structural dynamics of the endoplasmic reticulum mediated by cytoskeleton modifies luminal protein transport.** Jorge Toledo, Felix Urra, Claudia Reyes, Daniela Flores, Javiera Bruna, Mauricio Cerda, Felipe Santibáñez, Julio Cesar Cárdenas, Christian Gonzalez-Billault, Steffen Härtel, Andrés Couve. CHILEAN SOCIETY FOR CELLBIOLOGY XXIX ANNUAL MEETING. Puerto Varas, Octubre 25-29, 2015.

#### 9.4.- Actividades de extensión

- Director proyecto de Valoración y divulgación "MicroMundo" (micromundo.microscopíavirtual.cl) noviembre 2014 - a la fecha.
- Jurado XIV Congreso Nacional EXPLORA, noviembre-2013-2014-2015.
- Jurado XIV Congreso EXPLORA, región metropolitana. Noviembre-2013-2014-2015.
- Asesor científico de "Axón", serie micro documental sobre el funcionamiento del cerebro humano – II Concurso Nacional de productos de apropiación social de la ciencia y la tecnología, Explora CONICYT. 2013-actualidad.
- Asesor científico, elaboración del video-juego "El escape de Kai" del proyecto Dendros, Instituto de Neurociencia Biomédica, BNI. 2013.
- Exhibición de imágenes de microscopía, Planetario-USACH, actividad "Explorando mundos ocultos para descubrir nuevos medicamentos", Explora Conicyt e Instituto de Neurociencia Biomédica, BNI. 1 de octubre 2013.
- Documental "Mentes Transformadoras" Imágenes de microscopía y material suplementario. Diciembre 2014.
- Redacción Dossier instructivo del Año 2015 EXPLORA CONICYT CONOCER ILUMINA, Área Comunicación de la Ciencia- Programa EXPLORA. Noviembre 2014.
- Redacción "Agenda 2015" EXPLORA CONICYT CONOCER ILUMINA, Área Comunicación de la Ciencia- Programa EXPLORA, enero 2015.
- Revista de divulgación científica "Chile Tiene Su Ciencia", redacción de 3 diferentes actividades experimentales, 2015, Explora Conicyt. Mayo 2015.
- "Libro de Actividades 2015", diseño y redacción de 3 diferentes actividades experimentales, Semana nacional de la ciencia y la tecnología 2015, Explora Conicyt. Septiembre 2015.
- Asesor científico, elaboración de la serie animada "Locos Lab" productora Dinogorila. Diciembre 2016-a la fecha.
- Delegación oficial de la Universidad de Chile, Escuelas de Temporada, Vicerrectoría de Extensión y Comunicación; taller de biomedicina; Punta Arenas, Puerto Natales; Porvenir. Enero 2016.