



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

La proteína DOR/TP53INP2 modula negativamente la mitofagia dependiente de Parkin

Hilda Yuliana Enciso Salas

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universitat de Barcelona
Facultad de Biología
Programa de Doctorado en Biomedicina

**La proteína DOR/TP53INP2 modula
negativamente la mitofagia dependiente
de Parkin**

Hilda Yuliana Enciso Salas

Barcelona, 2017



Universitat de Barcelona
Facultad de Biología
Programa de Doctorado en Biomedicina



“La proteína DOR/TP53INP2 modula negativamente la mitofagia dependiente de Parkin”

Memoria presentada por Hilda Yuliana Enciso Salas
para optar al título de doctor por la Universitat de Barcelona

Antonio Zorzano Olarte

Hilda Yuliana Enciso Salas

Barcelona, 2017

Copyright © 2017 by Hilda Yuliana Enciso Salas

All Rights Reserved

“It’s the questions we can’t answer that teach us the most. They teach us how to think. If you give a man an answer, all he gains is a little fact. But give him a question and he’ll look for his own answers”

Patrick Rothfuss, *The wise man’s fear*.

A mis padres, porque su amor es tan grande que ahora estoy aquí.

A mis hermanos, porque sus logros también son los míos.

A Quim, que entró en mi mundo.

1. ÍNDICE	10
2. LISTA DE FIGURAS	11
3. LISTA DE TABLAS	2
4. LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	3
5. CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	7
1. Mitocondria	7
a. Origen.....	7
b. Estructura	7
c. Bioenergética mitocondrial	9
d. Biogénesis mitocondrial	21
e. Dinámica mitocondrial	22
f. Mecanismos de control de calidad.....	24
2. Autofagia	26
a. Autofagia no selectiva y selectiva	28
b. Mitofagia	30
c. Mitofagia inducida por PINK1/Parkin	33
d. PINK1.....	33
e. Parkin.....	35
f. Mecanismo de la mitofagia mediada por PINK1/Parkin.....	38
3. TP53INP2	43
a. Función en el núcleo	44
b. Función en la autofagia	45
6. CAPÍTULO 2. OBJETIVO DEL ESTUDIO	51
7. CAPÍTULO 3. RESULTADOS	53
1. Estudio de la regulación de la biología mitocondrial por TP53INP2	53
1.1. Modelos utilizados.....	53
1.2. Masa mitocondrial.....	54
1.3. Cuantificación de ADN mitocondrial por PCR en tiempo real	55
1.4. Potencial de membrana mitocondrial	57
1.5. Estrés oxidativo	59
1.6. Respiración mitocondrial	63
1.7. Biogénesis mitocondrial.....	65
2. Estudio de la regulación de la actividad autofágica mitocondrial por TP53INP2	68
2.1. Localización de TP53INP2 en condiciones de daño mitocondrial.....	68
2.1.1. Utilizando células MitoDsRed	68
2.1.2. En células transfectadas con GFP-LC3	69
2.1.3. En células transfectadas con YFP-Parkin.....	69
2.1.4. Utilizando Valinomicina	70
2.1.5. Utilizando Deferoxamina	71

3.	Efecto de TP53INP2 en la vía PINK1/Parkin	72
3.1.	TP53INP2 reduce la degradación de las mitocondrias en la vía PINK1/Parkin	72
3.2.	TP53INP2 inhibe la acumulación de PINK1 en células HeLa YFP-Parkin.....	74
3.3.	TP53INP2 no inhibe la acumulación de PINK1 en células HeLa	75
3.4.	TP53INP2 inhibe la formación de Ubiquitina fosforilada en S65	79
3.5.	TP53INP2 inhibe la degradación de Mitofusina 2.....	79
3.6.	TP53INP2 interactúa con Parkin	80
3.7.	TP53INP2 interactúa con una forma corta de Parkin y pierde la interacción con una forma mutante de Parkin.....	82
8.	CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.....	94
9.	CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
1.	Materiales	99
1.1.	Cultivos celulares.....	99
1.2.	Transfección	100
1.3.	Titulación de adenovirus.....	100
1.4.	Generación e infección con lentivirus.....	101
1.5.	Análisis de proteínas.....	101
1.6.	Inmunoprecipitación.....	106
1.7.	Transformación y purificación.....	106
1.8.	Extracción de RNA	106
1.9.	Retrotranscripción inversa	106
1.10.	Extracción de DNA	107
1.11.	rtPCR.....	107
1.12.	Generación de una forma corta de Parkin (Δ UBL).....	108
1.13.	Generación de mutantes de Parkin (wt C431A y Δ Ubl C431A).....	108
1.14.	Inmunofluorescencia	110
1.15.	Tinción con Mitotracker Deep Red	110
1.16.	Análisis del potencial de membrana mitocondrial	110
1.17.	Determinación de la oxidación mitocondrial	110
1.18.	Respiración mitocondrial	110
2.	Métodos.....	112
2.1.	Cultivos celulares.....	112
2.1.1.	Líneas celulares	112
2.1.2.	Procedimientos habituales durante la manipulación de células	113
2.1.2.1.	Tripsinización y conteo de células	113
2.1.2.2.	Congelación y descongelación de células.....	115
2.1.3.	Transfección.....	116
2.1.3.1.	Transfección transitoria utilizando el método químico.....	117
2.1.3.2.	Transducción (utilizando el método químico)	118
2.1.4.	Amplificación de adenovirus.....	119
2.1.5.	Titulación de adenovirus.....	120
2.1.6.	Generación e infección con lentivirus.....	123
2.2.	Análisis de proteínas.....	126
2.2.1.	Obtención de extractos totales.....	126
2.2.2.	Cuantificación de proteínas	126
2.2.3.	Western blot	127
2.2.3.1.	Preparación de la muestra.....	127
2.2.3.2.	Electroforesis	127

2.2.3.3.	Transferencia	128
2.2.3.4.	Bloqueo, lavado e incubación con anticuerpos	128
2.2.3.5.	Stripping	129
2.2.3.6.	Cuantificación	129
2.2.4.	Inmunoprecipitación	130
2.2.4.1.	Lisis celular.....	130
2.2.4.2.	Preparación de la resina.....	131
2.2.4.3.	Elución con el péptido Flag.....	131
2.3.	Técnicas de ADN.....	132
2.3.1.	Transformación	132
2.3.2.	Purificación del ADN	132
2.3.3.	Extracción de RNA	134
2.3.4.	Transcripción inversa.....	134
2.3.5.	Extracción de ADN.....	137
2.3.6.	PCR en tiempo real.....	137
2.3.7.	Generación de una forma corta de Parkin Δ UBL.....	139
2.3.8.	Generación de mutantes de Parkin (wt C431A y Δ UBL C431A).....	144
2.4.	Técnicas de microscopia	145
2.4.1.	Inmunofluorescencia	145
2.4.2.	Microscopia confocal.....	147
2.5.	Análisis de la función mitocondrial.....	148
2.5.1.	Tinción con Mitotracker Deep Red	148
2.5.2.	Análisis del potencial de membrana mitocondrial utilizando TMRM	148
2.5.3.	Determinación de la oxidación mitocondrial utilizando MitoSOX.....	150
2.5.4.	Respiración mitocondrial	151
2.6.	Análisis estadístico.....	155

10. BIBLIOGRAFÍA..... 159

11. ANEXOS..... 171

Lista de Figuras

- Figura 1. Representación esquemática de una mitocondria
- Figura 2. Esquema del mecanismo de la fosforilación oxidativa.
- Figura 3. Esquema de la dinámica mitocondrial
- Figura 4. Tipos de autofagia
- Figura 5. Autofagia selectiva mediada por receptores
- Figura 6. Receptores autofágicos
- Figura 7. Los receptores que participan en la mitofagia
- Figura 8. Esquema del mecanismo de los receptores localizados en la membrana externa
- Figura 9. PINK1
- Figura 10. Mecanismos de importe de PINK1
- Figura 11. Mecanismo de ubiquitinación
- Figura 12. Esquema del mecanismo de activación de Parkin mediado por PINK1
- Figura 13. Ciclos de ubiquitinación y retroalimentación positiva inducidos por Parkin y formación de cadenas ubiquitiladas en las mitocondrias dañadas
- Figura 14. Expresión de TP53INP2
- Figura 15. Esquema del mecanismo de TP53INP2/DOR en la autofagia no selectiva.
- Figura 16. Niveles de expresión de TP53INP2
- Figura 17. Masa mitocondrial en células HeLa YFP-Parkin que sobreexpresan TP53INP2
- Figura 18. Masa mitocondrial en células L6E9
- Figura 19. Cuantificación del ADN mitocondrial mediante PCR en tiempo real en células HeLa YFP-Parkin
- Figura 20. Cuantificación del ADN mitocondrial mediante PCR en tiempo real en células L6E9
- Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de TP53INP2 en el potencial de la membrana mitocondrial (Ψ) en células HeLa YFP-Parkin
- Figura 22. Potencial de membrana mitocondrial corregido en células L6E9
- Figura 23. Producción de superóxido en condiciones de estrés oxidativo en células HeLa YFP-Parkin
- Figura 24. Producción de superóxido en condiciones de estrés oxidativo en células L6E9
- Figura 25. Respiración mitocondrial en el modelo de sobreexpresión de TP53INP2
- Figura 26. Respiración mitocondrial en el modelo de knockdown de TP53INP2
- Figura 27. Análisis de RNA mensajero de PGC-1 α , NRF1 y TFAM en células HeLa YFP-Parkin que sobreexpresan TP53INP2.
- Figura 28. Niveles de NRF1 y TFAM en el modelo L6E9 knockdown de TP53INP2
- Figura 29. Localización de TP53INP2 en células HeLa MitoDsRed
- Figura 30. Localización de TP53INP2 en células HeLa MitoDsRed transfectadas con GFP-LC3.
- Figura 31. Localización de TP53INP2 en células HeLa MitoDsRed transfectadas con YFP-Parkin.
- Figura 32. Localización de TP53INP2 en células HeLa MitoDsRed incubadas con Valinomicina
- Figura 33. Localización de TP53INP2 en células HeLa MitoDsRed incubadas con Deferoxamina
- Figura 34. Complejo avidina
- Figura 35. Tecnología Gateway
- Figura 36. Grafico seahorse
- Figura 37. Inhibidores de la cadena respiratoria

Lista de Tablas

Tabla 1. Plásmidos utilizados para transfectar

Tabla 2. Adenovirus utilizado

Tabla 3. Plásmidos utilizados en la infección lentiviral

Tabla 4. Preparación de geles de acrilamida

Tabla 5. Anticuerpos primarios

Tabla 6. Anticuerpos secundarios

Tabla 7. Sondas TaqMan®

Tabla 8. Primers utilizados para rtPCR utilizando SYBR® Green

Tabla 9. Primers utilizados para generar la forma corta Δ Ubl Parkin y para mutar Parkin

Tabla 10. Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia

Tabla 11. Derivación del área contada en campos/ pocillo

Tabla 12. Características de la PCR

Tabla 13. Ciclos de la PCR

Lista de abreviaturas y símbolos

ADN mitocondrial	
AIM	Atg8-interacting <i>motif</i>
ATG101	Autophagy-related protein 101
ATG13	Autophagy-related protein 13
ATP	Adenosin trifosfato
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
BNIP3L/NIX	BCL2/adenovirus E1B interacting <i>protein 3-like</i>
DRP1	dynamín-related protein 1
ERR α	Estrogen-related receptor alpha
FADH2	Flavin adenin dinucleótido reducido
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
FIS1	Mitochondrial fission 1 protein
FUNDC1	FUN14 domain-containing protein 1
GABARAP	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GATE16	Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa
HDAC6	histone deacetylase 6 protein
HSP60	Heat shock protein 60
IMS	Espacio intermembrana
LAMP-2A	Lysosome-associated membrane protein 2
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LIR	LC3-interacting region
MDV	Vesículas derivadas de mitocondrias
MFF	Mitochondrial Fission Factor
MID49	Mitochondrial dynamics protein MID49
MID51	Mitochondrial dynamics protein MID51
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MTS	Secuencia de orientación a la mitocondria
NADH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
NBR1	Next to BRCA1 gene 1 protein
NDP52	Nuclear dot protein 52, Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2
NRF1	Nuclear respiratory factor 1
OPA-1	Optic atrophy type 1
OPTN	Optineurina
Parkin	E3 ubiquitin-protein ligase parkin
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico
TIM	Traslucasa de la membrana interna
TOM	Traslucasa de la membrana externa
UBD	<i>Ubiquitin-binding domain</i>
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase 1, Serine/threonine-protein kinase ULK1

Capítulo 1. Introducción

INTRODUCCIÓN

1) Mitocondria

La mitocondria es un orgánulo celular que desempeña una gran variedad de tareas metabólicas en las células eucariotas. Entre ellas se puede citar la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa y del ciclo de Krebs, la β -oxidación, el ciclo de la urea, la síntesis de cuerpos cetónicos, la biosíntesis del grupo hemo y el metabolismo de los aminoácidos. Además de estas tareas metabólicas, las mitocondrias son responsables de la replicación de su propio ADN, de la transcripción y traducción de algunas proteínas mitocondriales, así como también del importe de aquellas proteínas mitocondriales que no pueden ser codificadas en la mitocondria y por lo tanto son codificadas en el núcleo. Otras funciones metabólicas son el almacenamiento de calcio, la producción y eliminación de especies oxidantes (ROS), la señalización y el secuestro de proteínas pro-apoptóticas con el propósito de mantener la supervivencia celular.

a) Origen

Hace algunas décadas se reformuló una antigua hipótesis sobre el origen de las mitocondrias, esta teoría conocida como endosimbiótica propone que las mitocondrias surgieron hace aproximadamente dos mil millones de años cuando una α -proteobacteria fue ingerida por un ancestro de las células eucariotas actuales. Para respaldar esta teoría se señalaron una serie de características como evidencias de ese lejano origen. Las pruebas de ese pasado bacteriano serían la presencia de dos membranas que conforman las mitocondrias, el contenido de un material genético propio, muy parecido al de las bacterias actuales. Otros argumentos señalan el tamaño similar, la bipartición, etc (Nunnari et al., 2012)(Duchen, 2004).

b) Estructura

Las mitocondrias están conformadas por dos membranas funcionalmente distintas, la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI), además de otros dos compartimientos conocidos como el espacio intermembrana (IMS) y la matriz.

La MME es una bicapa lipídica relativamente permeable a moléculas pequeñas y a especies iónicas, pero estudios recientes sugieren que podría constituir una barrera más importante y potencialmente regulada. Así por ejemplo, presenta un complejo proteico conocido como traslocasa de la membrana externa (TOM), que permite la traslocación y/o integración de proteínas precursoras a las membranas. TOM actúa como una puerta de entrada universal para todas las proteínas precursoras mitocondriales que son sintetizadas en el citosol (Duchen, 2004).

El espacio intermembrana es el área comprendida entre la MME y la MMI. Alberga algunas proteínas que juegan un papel importante en la fisiología celular, en la bioenergética mitocondrial y en la muerte celular, como por ejemplo; el citocromo c y la creatina quinasa.

La membrana mitocondrial interna forma la principal barrera entre el citosol y la matriz mitocondrial y a diferencia de la MME es en gran medida impermeable. Es aquí donde se encuentran los componentes del complejo translocasa de la membrana interna (TIM). Gracias a este complejo es posible la translocación de ciertas proteínas hacia la matriz mitocondrial. El complejo TIM también permite la inserción de determinadas proteínas a la membrana mitocondrial interna. Estructuralmente, la MMI suele representarse formando múltiples invaginaciones que dan lugar a las llamadas crestas mitocondriales. Estas formaciones son muy importantes puesto que, albergan una variedad de sistemas proteicos que participan en la cadena de transporte de electrones y la producción de ATP. Es importante destacar que la estructura de las crestas puede variar enormemente entre los diferentes tejidos o células.

En cuanto a la matriz mitocondrial, esta estructura alberga un importante número de proteínas esenciales para las diferentes funciones que desempeña la mitocondria. Así por ejemplo, contiene varias de las enzimas implicadas en procesos metabólicos, como el del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis de los centros Fe-S y la síntesis del grupo hemo. La matriz también alberga una serie de copias del ADN mitocondrial (ADNmt) y la maquinaria de proteínas implicada en su mantenimiento y replicación, así como también componentes implicados en la transcripción y traducción.

En el ser humano, el ADNmt es una molécula circular simple de 16,569 pares de bases que se encuentra empaquetada formando unas estructuras punteadas, adyacentes a la membrana interna, llamadas nucleoides. El ADNmt humano contiene 37 genes y codifica para 13 proteínas, 22 RNA de transferencia y 2 RNA ribosómicos. Todas las proteínas codificadas son subunidades que participan en la generación de energía en forma de ATP. Las otras subunidades necesarias para la síntesis de ATP están codificadas por genes nucleares y deben ser importadas a las mitocondrias. Además, todas las proteínas implicadas en la replicación, transcripción y traducción del ADNmt también están codificadas por genes nucleares.

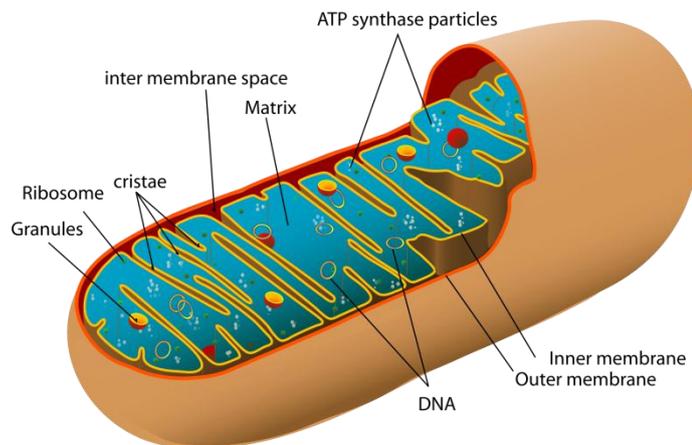


Figura 1. Representación esquemática de una mitocondria donde pueden apreciarse los diferentes componentes descritos.

c) Bioenergética mitocondrial

La mitocondria tiene una serie de funciones fundamentales, las cuales han sido señaladas previamente. Sin lugar a dudas, la producción de ATP es uno de los principales mecanismos de suministro de energía para la célula.

La síntesis de ATP o también llamada bioenergética mitocondrial comienza con la oxidación de la acetil-Coenzima A (acetil-CoA), un intermediario fundamental rico en energía, proveniente del metabolismo de la glucosa, de los ácidos grasos y de los aminoácidos. La oxidación de la acetil-CoA se desarrolla en la matriz mitocondrial, a través de un proceso conocido como el ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). Esta ruta metabólica genera dos sustratos reducidos NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido) y $FADH_2$ (flavín adenin dinucleótido reducido). Ambos muy importantes debido a que se desempeñan como intermediarios óxido-reductores capaces de transportar electrones hasta la cadena mitocondrial respiratoria.

La cadena mitocondrial respiratoria está conformada por cuatro complejos multiproteicos denominados I, II, III, IV y dos transportadores de electrones, la coenzima Q, llamada también ubiquinona, y el citocromo c. Todos ellos participan en un proceso conocido como transporte de electrones, el cual tiene lugar en la membrana mitocondrial interna. Los sustratos antes mencionados NADH y FADH₂, son los donadores de los electrones que serán transportados a través de la cadena respiratoria. Durante su recorrido los electrones viajan de un complejo a otro y participan en una serie de reacciones de oxidación y reducción, a menudo denominadas también REDOX. Gracias a esta cadena de reacciones se produce un desplazamiento de protones hacia el espacio intermembrana y de esta manera se genera un gradiente electroquímico, es decir se crea un incremento de la concentración de protones y por lo tanto un aumento de la carga positiva.

La energía generada por este gradiente es posteriormente aprovechada por la enzima ATP sintasa, o a veces llamada también complejo V, para generar ATP. Esto ocurre a través de un proceso conocido como quimiosmosis. Durante el cual, los protones altamente concentrados en el espacio intermembrana se desplazan hacia la matriz, a través de la enzima ATP sintasa. La energía cinética de este desplazamiento es utilizada por la enzima para fosforilar el adenosín dinucleótido fosforilado (ADP) y producir ATP, además este proceso de retorno produce cambios en la configuración espacial de la ATP sintasa.

En cuanto a los electrones transportados a través de la cadena respiratoria, estos finalmente son transferidos al oxígeno molecular (O₂), reduciéndolo a H₂O. Sin embargo debido a la pérdida de electrones en el complejo I o el complejo III, el O₂ puede ser incompletamente reducido y generar una molécula muy inestable y conocida como precursora de la mayoría de las especies reactivas de oxígeno, el anión superóxido. Es importante señalar que los bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan papeles fisiológicos, mientras que concentraciones elevadas y / o prolongadas de ROS pueden oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, conduciendo a disfunción celular y muerte celular programada.

En resumen, la fosforilación oxidativa es el proceso en el cual se forma ATP como resultado de la transferencia de electrones desde el NADH o FADH₂ al O₂ a través de una serie de transportadores de electrones.

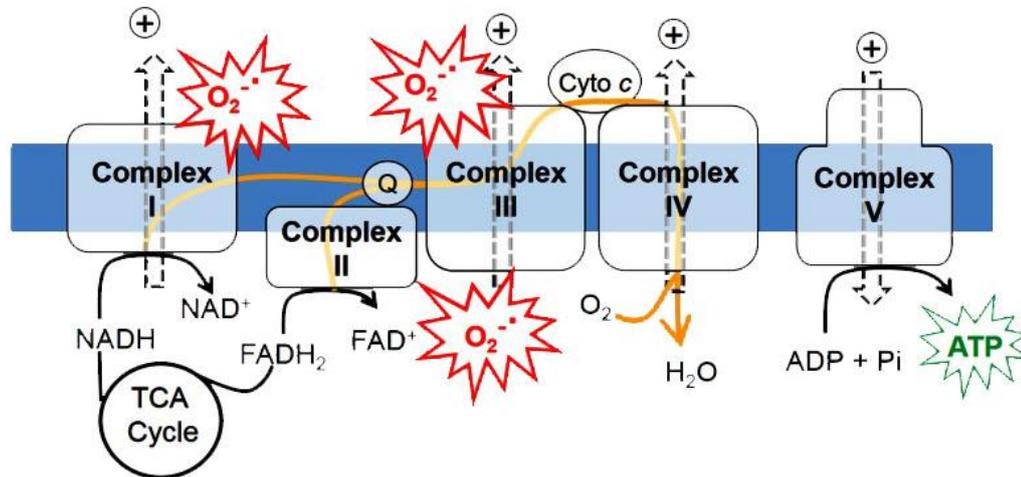


Figura 2. Esquema del mecanismo de la fosforilación oxidativa. Siguiendo las flechas de color naranja se puede observar el origen y el transporte de los electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria. Tal como se señaló en el texto, los protones (H⁺) provenientes de las reacciones REDOX son conducidos hacia el espacio intermembrana (flechas de línea discontinua). Posteriormente, el retorno de protones a través de la ATP sintasa (complejo V) da lugar a la formación de ATP. En el complejo IV, el oxígeno sirve como el aceptor final de electrones, dando lugar a la formación de agua. Adaptado de (Hamacher-Brady & Brady, 2016a)

d) Biogénesis mitocondrial

Cada célula contiene de cientos a miles de mitocondrias; sin embargo, el tamaño, la forma y la abundancia de las mitocondrias varían dramáticamente en los diferentes tipos celulares. Además estas características pueden cambiar bajo diferentes demandas energéticas, condiciones fisiológicas y características del entorno celular.

La biogénesis mitocondrial se define como el conjunto de instrucciones moleculares según las cuales las células reemplazan o aumentan el número de estos orgánulos a través de la división y crecimiento de mitocondrias preexistentes, dado que las mitocondrias no se sintetizan *de novo*. Este proceso requiere el reclutamiento de nuevas proteínas, las cuales se añaden a los componentes existentes. Aunque las mitocondrias tienen su propio ADN, aproximadamente el 98% de las estructuras proteicas que las conforman están codificados por el genoma nuclear. Es decir, la capacidad de codificación de proteínas del ADNmt sólo cubre la síntesis de 13 subunidades de los complejos proteicos del aparato respiratorio. En tanto que la

mayoría de las proteínas de la cadena respiratoria y todos los otros productos necesarios para las funciones mitocondriales se derivan de los genes nucleares. Por lo tanto este proceso necesita una estrecha coordinación entre los dos genomas. Así por ejemplo, la intercomunicación núcleo-mitocondria depende de la interacción entre los factores de transcripción (NRF-1, NRF-2, PPAR α , ERR α) y los miembros de la familia de coactivadores y reguladores PGC-1 (PGC-1 α , PGC-1 β y PRC). Estos factores de transcripción se dirigen a genes que codifican para la cadena respiratoria, la transcripción mitocondrial, la maquinaria de traducción y replicación y los aparatos de importación y ensamblaje de proteínas, entre otros. A su vez, estos factores son activados directa o indirectamente por los coactivadores de la familia PGC-1 cuya expresión diferencial está controlada por una serie de señales ambientales que incluyen temperatura, privación de energía, disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento (Palikaras & Tavernarakis, 2014; Scarpulla, 2008).

e) **Dinámica mitocondrial**

La dinámica mitocondrial, también llamada fusión y fisión mitocondrial, es un proceso continuo de remodelación de la red mitocondrial que ocurre durante el ciclo de vida de la célula. Este mecanismo es importante para el crecimiento, la redistribución mitocondrial y para el mantenimiento de una red mitocondrial saludable (Fischer et al., 2012; Friedman & Nunnari, 2014; Westermann, 2010).

Durante mucho tiempo las mitocondrias fueron consideradas como unas estructuras independientes y aisladas entre sí; sin embargo, hace unas décadas los estudios de microscopía celular *in vivo* demostraron que las mitocondrias son unos orgánulos altamente dinámicos que se mueven continuamente a lo largo del citoesqueleto, fusionándose y dividiéndose frecuentemente, de tal manera que pueden construir grandes redes intracelulares e interconectadas. Todas estas actividades coordinadas, controlan la morfología mitocondrial y la distribución intracelular y a su vez determinan la apariencia específica de estos orgánulos de acuerdo al tipo celular (Westermann, 2010).

El comportamiento opuesto y balanceado de la maquinaria de fusión y fisión mitocondrial permite que la célula responda a las variables condiciones fisiológicas. Un cambio hacia la fusión favorece la generación de mitocondrias interconectadas, mientras que, un desplazamiento hacia la fisión produce numerosas mitocondrias

fragmentadas. Las grandes redes mitocondriales que son generadas por la fusión son beneficiosas para las células metabólicamente activas, en las que contribuyen a la disipación de la energía. Por el contrario, en las células quiescentes las mitocondrias están con frecuencia presentes como numerosas esferas pequeñas o barras cortas morfológica y funcionalmente distintas (Westermann, 2010).

La fusión mitocondrial en los mamíferos está mediada por unas proteínas GTPasas, las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y 2) localizadas en la membrana mitocondrial externa y OPA1 (*optic atrophy 1*) ubicada en la membrana interna. En el caso de las mitofusinas, éstas son las responsables de la fusión de los túbulos de las membranas mitocondriales a través de interacciones homotípicas y heterotípicas. Mientras que, OPA1 es indispensable para la fusión de las membranas internas y la formación de las crestas, además se cree que esta proteína interactúa con las mitofusinas para formar los complejos proteicos intermembrana que acoplan los procesos de fusión de las dos bicapas lipídicas que rodean a la mitocondria. En cuanto a la pérdida de mitofusinas u OPA1, este efecto conduce a un fenotipo bastante similar al de la fragmentación mitocondrial, lo que sugiere que ambos procesos de fusión están afectados. Por otra parte, estas GTPasas son controladas por una variedad de mecanismos, como la ubiquitinación y el proteasoma en el caso de las mitofusinas y la regulación proteolítica a través de diferentes proteasas mitocondriales en el de OPA1 (Hamacher-Brady & Brady, 2016b; Nunnari et al., 2012).

En cambio, la fisión mitocondrial es controlada por la proteína GTPasa DRP1 (Dynamin related protein 1). Normalmente citosólica, DRP1 es reclutada a la mitocondria a través de las proteínas Fis1, MFF, MID49 y MID51, todas ellas ubicadas en la membrana mitocondrial externa. La fosforilación de DRP1 en el aminoácido serina 656 por la proteína quinasa A (PKA) inhibe su actividad, esta acción da lugar a redes mitocondriales hiperfusionadas (Cribbs & Strack, 2007). El efecto inverso, la desfosforilación por la proteína calcineurina fosfatasa, activa DRP1. Posteriormente la proteína DRP1 activada constriñe y fragmenta las mitocondrias, de esta manera se genera orgánulos distintos morfológicamente y funcionalmente (Hamacher-Brady & Brady, 2016b).

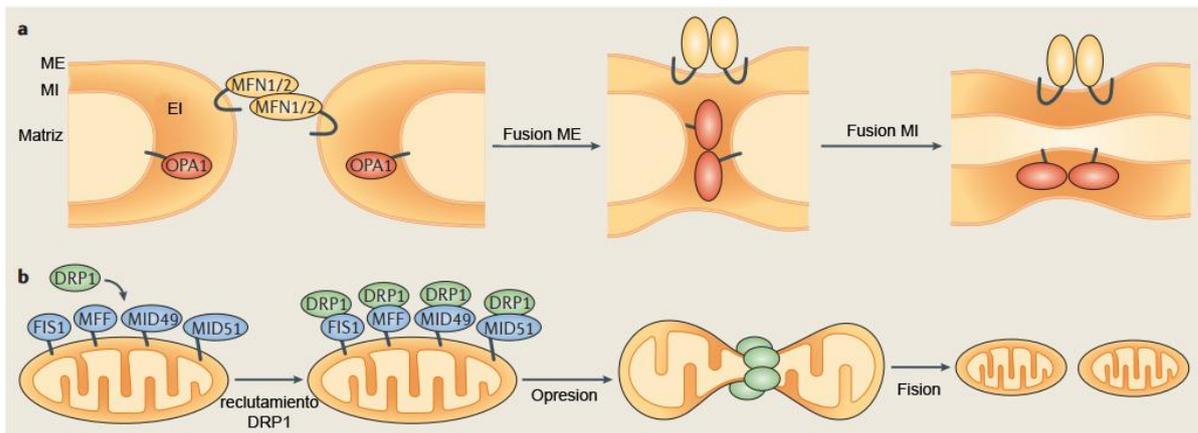


Figura 3. Esquema de la dinámica mitocondrial. a) Fusión y b) fisión mitocondrial (Mishra & Chan, 2014).

f) Mecanismos de control de calidad

La mitocondria continuamente produce aniones superóxido (O_2^-) altamente reactivos como productos secundarios del transporte de electrones durante la síntesis de ATP. Estas especies reactivas de oxígeno causan daño a las proteínas, lípidos y ADN. El daño proteico de los componentes de la cadena de transporte de electrones puede empeorar la situación produciendo más ROS. Por lo tanto, el control de calidad mitocondrial es de vital importancia para mantener la funcionalidad de las mitocondrias. Así mismo otros procesos de control de calidad son necesarios para el metabolismo de adaptación y supervivencia en respuesta al estrés celular (M. J. Baker, Tatsuta, & Langer, 2011; Tatsuta & Langer, 2008).

La mitocondria utiliza diferentes mecanismos de control de calidad. Así por ejemplo a nivel molecular utiliza chaperonas como HSP60 para la reparación de las proteínas mal plegadas o proteasas como Lon y ClpXP, dependientes de ATP, para eliminar las proteínas dañadas en la matriz. Adicionalmente, en la membrana interna las mitocondrias poseen su propio sistema proteolítico, dos complejos de proteasas AAA^+ , cuya función es degradar proteínas de membrana mal plegadas. Asimismo, un número adicional de proteasas está localizada en esta membrana, como por ejemplo la metalopeptidasa Oma1, responsable de la degradación de OPA1. En cuanto a las proteínas de la membrana externa, éstas juegan un papel importante en la regulación del metabolismo, la apoptosis y otros eventos de señalización. Por lo tanto, el control de calidad de estas proteínas es también de alta importancia. Sin embargo, la información sobre cómo se mantiene el control de calidad de éstas apenas comienza a surgir. Recientemente se identificó que ciertas proteínas de membrana externa como las mitofusinas son ubiquitinadas y posteriormente degradadas a través del

proteasoma en respuesta a ciertos tipos de estrés (Ashrafi & Schwarz, 2012; Michael J. Baker, Tatsuta, & Langer, 2011; Tanaka et al., 2010; Tatsuta, 2009).

El segundo nivel de control de calidad mitocondrial surge debido a la naturaleza dinámica del propio orgánulo. Tal como se explicó en párrafos anteriores, las mitocondrias se fusionan y se dividen constantemente para reparar componentes dañados, esto permite el intercambio de material entre las mitocondrias sanas a través de la fusión y la segregación de las mitocondrias dañadas a través de la fisión. Posteriormente, las mitocondrias segregadas son encapsuladas en autofagosomas y degradadas en los lisosomas a través de un proceso denominado autofagia. Otro mecanismo, que a diferencia del anterior no involucra la degradación de todo el orgánulo sino de partes específicas de la mitocondria, son las vesículas derivadas de mitocondrias (MDV). Estas vesículas de aproximadamente 70-100 nm son generadas en condiciones de estrés oxidativo y pueden contener partes de la matriz y de la membrana mitocondrial interna. Finalmente las proteínas oxidadas son transportadas en las vesículas hacia los lisosomas donde son degradadas (Michael J. Baker et al., 2011; Shlevkov & Schwarz, 2014).

El tercer nivel de control de calidad ocurre a nivel celular cuando el daño mitocondrial es muy extenso. En esta etapa se promueve la liberación de factores pro-apoptóticos que dan como resultado la remoción de toda la célula a través de la apoptosis (Michael J. Baker et al., 2011).

2) Autofagia

La autofagia es un término general para describir la entrega y degradación de componentes intracelulares en los lisosomas. Aunque es comúnmente etiquetada como una vía de degradación es más adecuado considerarla una vía de reciclaje para resaltar su importancia en la fisiología de las células. Los metabolitos generados en los lisosomas como resultado de la autofagia son reutilizados como fuente de energía y/o para la síntesis de nuevas macromoléculas (Boya, Reggiori, & Codogno, 2013; Mizushima, 2007).

En casi todas las células coexisten varios tipos de autofagia, los cuales se diferencian por los mecanismos de entrega de los sustratos en los lisosomas. La macroautofagia y la microautofagia son variantes del proceso autofágico, en ambos mecanismos, regiones enteras del citosol o componentes de éste, como orgánulos, complejos proteicos, agregados proteicos, patógenos, etc. son secuestrados en vesículas. Posteriormente, las enzimas lisosomales acceden a los componentes encapsulados a través de la fusión directa de las vesículas con los lisosomas, como es el caso de la macroautofagia, o por la internalización de las vesículas en la membrana lisosomal, en el de la microautofagia. Un tercer tipo, dedicado exclusivamente a la degradación de proteínas solubles, es la autofagia mediada por chaperonas. Este tipo difiere de las otras dos en el mecanismo de reconocimiento de las proteínas que serán degradadas y en la forma en que son entregadas al lisosoma. Específicamente en este proceso, la chaperona citosólica Hsc-70 reconoce a las proteínas diana a través de un motivo bioquímicamente relacionado al pentapéptido KFERQ. La interacción entre la chaperona y el sustrato forma un complejo, el cual es específicamente translocado a través de la membrana lisosomal, gracias a la proteína LAMP-2A (Glick, Barth, & Macleod, 2010; Kaushik et al., 2011; Mizushima, 2007).

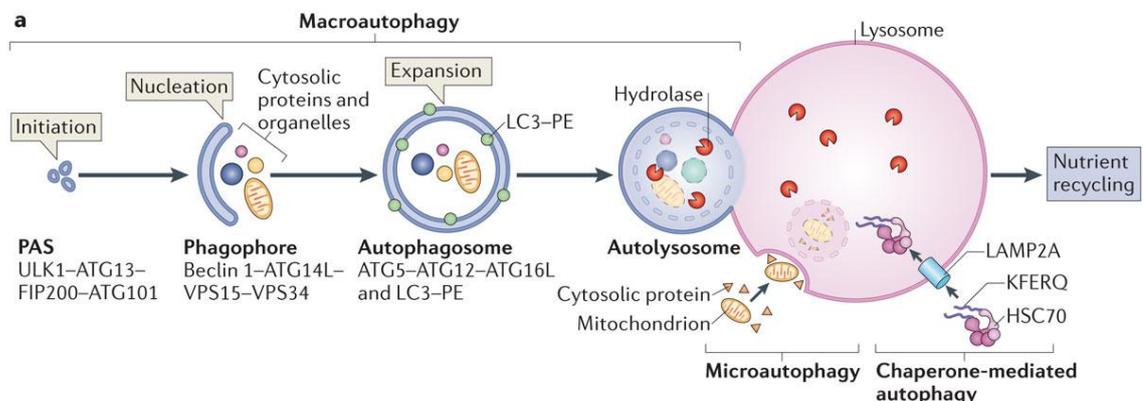


Figura 4. Tipos de autofagia. a) Macroautofagia, b) Microautofagia, c) Autofagia mediada por chaperonas (Kaur & Debnath, 2015).

A continuación se explicará en más detalle la macroautofagia que en adelante se denominará autofagia. Tal como se indicó, la autofagia es el mecanismo responsable de la encapsulación de proteínas de vida larga, orgánulos y agregados proteicos en el autofagosoma. El proceso de producción del autofagosoma comprende tres pasos principales: iniciación, nucleación y elongación y cierre (Kaur & Debnath, 2015).

El confuso proceso se inicia en un lugar especializado denominado PAS (phagophore assembly site) donde proteínas del complejo ULK (UNC51-like kinase), ULK1 o ULK2, ATG13, FIP200 y ATG101, se ensamblan para dar comienzo a la formación de la membrana. Posteriormente, en la etapa de nucleación, el complejo ULK activado recluta al complejo de clase III PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa) conformado por las proteínas Beclin 1, VPS15 (vacuolar protein sorting 15), VPS34 y ATG14 para promover la producción local de fosfatidilinositol 3 fosfato, un fosfolípido específico de los autofagosomas (Kaur & Debnath, 2015). Es conveniente señalar que a pesar de las numerosas investigaciones realizadas en este campo, el origen de las membranas que contribuyen a la formación del autofagosoma en las células de mamíferos no está completamente definido. Los estudios realizados hasta la fecha demuestran que la nucleación del preautofagosoma ocurre en diferentes regiones enriquecidas con fosfatidilinositol 3 fosfato en el retículo endoplásmico (RE), denominadas omegasomas (Axe et al., 2008). Otras fuentes que también se han demostrado contribuyen a la formación de la membrana son el compartimiento intermedio entre el RE y el complejo de Golgi, las uniones RE-mitocondria, las mitocondria, los endosomas y la membrana plasmática (McEwan & Dikic, 2010; Tooze & Yoshimori, 2010).

En la etapa de elongación y cierre, dos sistemas similares al proceso de conjugación de la ubiquitina que involucran proteínas para la activación y conjugación de los sustratos se llevan a cabo. Estos son ATG5-ATG12 y ATG8/LC3/GABARAP-fosfatiletanolamina. Inicialmente, ATG7 es requerido para la conjugación de ATG5 y ATG12, posteriormente, el complejo ATG5-ATG12 es conjugado con ATG16, finalmente, el complejo resultante es incorporado principalmente a la porción externa de la membrana del autofagosoma y es utilizado como una E3 ligasa para conjugar las proteínas ATG8 a la fosfatiletanolamina (PE) (Boya et al., 2013; Kaur & Debnath, 2015; Mizushima, 2007; Mizushima, Yoshimori, & Ohsumi, 2011a).

En la células de mamífero existen 6 ortólogos de ATG8; LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2/GATE16. Es importante destacar que LC3 es considerado como el principal homólogo mamífero de la proteína ATG8. Las proteínas LC3 conjugadas a la PE (también conocida como LC3-II) se localizan a ambos lados de la membrana de aislamiento y fundamentalmente, permanecen asociadas con el autofagosoma incluso después de la fusión con el lisosoma, donde finalmente son degradados junto con el material encapsulado. Este comportamiento único, así como también la capacidad de conjugación a un fosfolípido importante de la membrana son habitualmente explotados para monitorear el flujo autofágico y la inducción o inhibición de la autofagia (Mizushima, Yoshimori, & Ohsumi, 2011b; Wild, McEwan, & Dikic, 2014).

Adicionalmente, las proteínas LC3 juegan un rol importante en el reclutamiento selectivo de la carga de los autofagosomas y sirven como sitios de acoplamiento para proteínas que contienen una secuencia hidrofóbica peptídica denominada LIR, del inglés LC3-interacting región, en el caso de los mamíferos y AIM (ATG8-interacting motif) en las levaduras (Wild et al., 2014).

Una vez culminado el proceso de elongación y cierre, el autofagosoma está listo para fusionarse con el lisosoma y exponer su contenido a las hidrolasas presentes en el interior de este orgánulo. Sin embargo, el mecanismo molecular exacto de la fusión de la membrana autofágica no está completamente dilucidado. Se presume que este proceso se encuentra regulado por proteínas SNARE y otros factores que incluyen a las proteínas ATG14, la proteína SNARE, STX17 y LC3 (Wang et al., 2016).

a) Autofagia no selectiva y selectiva

Durante mucho tiempo la autofagia fue considerada como un proceso de degradación no selectivo. Sin embargo, en los últimos años numerosos tipos de autofagia selectiva han sido descritos. Es así que bajo condiciones específicas los autofagosomas pueden secuestrar y degradar exclusivamente mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas, lípidos, gránulos secretores, agregados citoplasmáticos, ribosomas y patógenos (Boya et al., 2013).

Se define que la autofagia no selectiva ocurre en condiciones de ayuno, con el propósito de abastecer a las células de metabolitos esenciales y energía hasta que

éstos puedan ser nuevamente obtenidos del medio extracelular. En cambio, la autofagia selectiva ocurre en condiciones fisiológicas que requieren el mantenimiento de una población adecuada o para remover orgánulos dañados, agregados proteicos, etc., que de otro modo podrían ser tóxicos (Youle & Narendra, 2011b).

La autofagia selectiva es mediada por receptores específicos que facilitan el secuestro de los componentes a degradar en los autofagosomas. Los receptores autofágicos interactúan directamente con la estructura que debe ser específicamente eliminada a través de marcadores de degradación como la ubiquitina, gracias a la presencia de un dominio de unión a ubiquitina (UBD). Estos receptores además poseen un motivo llamado región de interacción con LC3 (LIR), el cual media su unión a la superficie interna del autofagosoma en crecimiento (Boya et al., 2013; Kaur & Debnath, 2015).

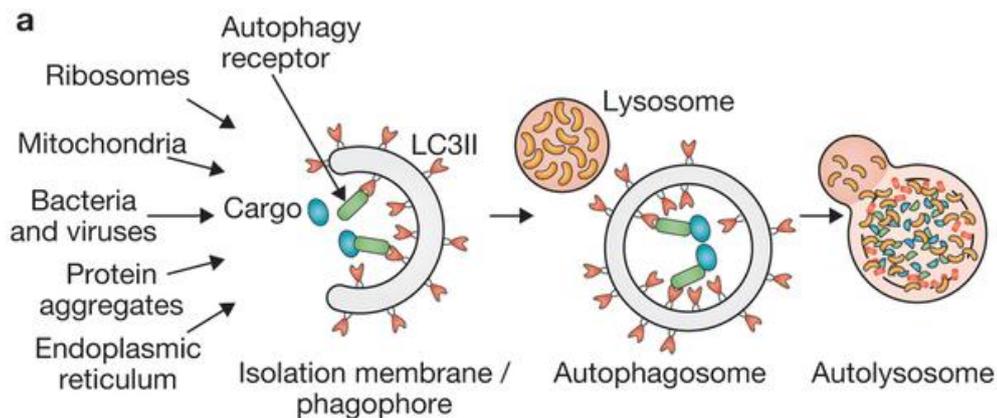


Figura 5. Autofagia selectiva mediada por receptores, obsérvese que los receptores interactúan con LC3 y al mismo tiempo con la carga del autofagosoma (Stolz, Ernst, & Dikic, 2014b).

Algunos ejemplos de receptores autofágicos son la proteína p62, también conocida como SQSTM1, NBR1 (next to BRCA1 gene 1 protein), la histona deacetilasa 6 (HDAC6), NDP52 (nuclear dot protein 52), optineurina (OPTN), etc., (Ashrafi & Schwarz, 2012; Hamacher-Brady & Brady, 2016b; Kaur & Debnath, 2015; Stolz, Ernst, & Dikic, 2014a).

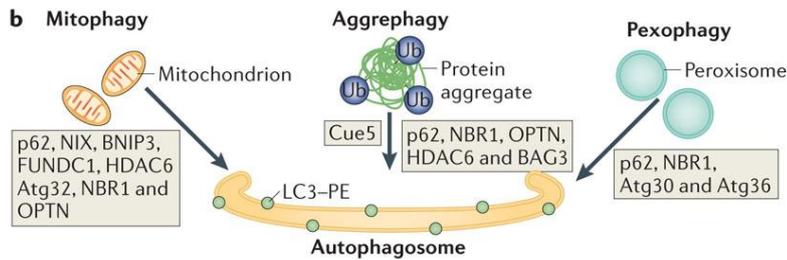


Figura 6. Receptores autofágicos, este tipo de proteínas participan en diversos procesos selectivos de autofagia (Kaur & Debnath, 2015).

b) Mitofagia

Uno de los tipos más estudiados de autofagia selectiva es la mitofagia, que media la remoción específica de mitocondrias. Hasta la fecha de hoy, diferentes receptores de autofagia y mecanismos han sido caracterizados y pueden ser clasificados como dependientes o independientes de ubiquitina (Hamacher-Brady & Brady, 2016b; Khaminets, Behl, & Dikic, 2015).

El mecanismo que involucra la ubiquitinación de las proteínas de membrana externa por parte del sistema PINK1 / Parkin es el más estudiado. Este proceso utiliza las cadenas ubiquitiladas en la membrana mitocondrial externa como un mecanismo para reclutar receptores que poseen un dominio de unión a ubiquitina. Estos receptores son optineurina, NDP52, p62 y NBR1 (Koji Yamano et al., 2016).

En el caso de la mitofagia independiente de ubiquitina, los receptores que se han descrito son BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein interacting protein 3), NIX (NIP3-like protein X) / BNIP3L, Bcl2L13 (Bcl-2-like protein 13) y FUNDC1 (FUN14 domain-containing 1)(Hamacher-Brady & Brady, 2016b). Estas proteínas se encuentran localizadas constitutivamente, a través de dominios transmembrana, en la membrana mitocondrial externa. Este conjunto de macromoléculas se encuentra regulado transcripcionalmente y su actividad como receptores de mitofagia se debe a una interacción directa con LC3 y GABARAB, a través de sus motivos LIR. Adicionalmente, esta interacción se encuentra regulada mediante la fosforilación de residuos de aminoácidos adyacentes al motivo peptídico LIR (Hamacher-Brady & Brady, 2016b; Zhang, Wu, Liu, Zhu, & Chen, 2013).

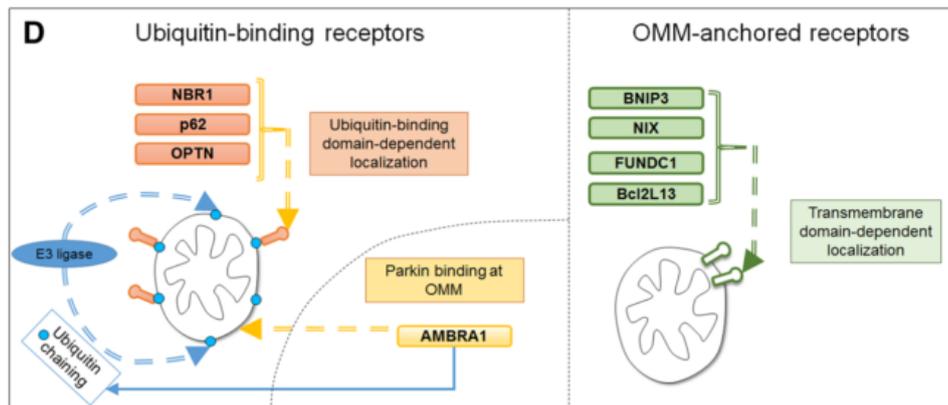


Figura 7. Los receptores que participan en la mitofagia son de dos tipos, unos que presentan una secuencia de reconocimiento a la ubiquitina o proteínas ubiquitiladas y otros que se encuentran localizados en la membrana externa mitocondrial y poseen la secuencia peptídica denominada LIR, que les permite interaccionar con las proteínas ATG8 (Hamacher-Brady & Brady, 2016b).

BNIP3 y su homólogo NIX/BNIP3L son miembros atípicos de la subfamilia proapoptótica Bcl-2, comparten un 56% de homología en la secuencia de sus aminoácidos. Adicionalmente, ambas proteínas presentan un dominio citoplasmático que contiene un motivo LIR. BNIP3 regula la mitofagia en condiciones de hipoxia. En cuanto a NIX, esta proteína se identificó originalmente como un mediador de la remoción de mitocondrias durante la maduración de los eritrocitos pero recientemente se ha demostrado que está también involucrado en la mitofagia inducida por la pérdida de potencial de membrana ($\Delta\Psi$) (Hamacher-Brady & Brady, 2016b; Ney, 2015; Novak et al., 2010). La expresión de las proteínas NIX y BNIP3 está parcialmente bajo el control de HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) y su desregulación durante la hipoxia promueve la remoción de las mitocondrias dañadas (Georgakopoulos, Wells, & Campanella, 2017; Hamacher-Brady & Brady, 2016a; Ney, 2015; Youle & Narendra, 2011a).

Bcl2L13 es el homólogo mamífero de la proteína ATG32, esencial para la mitofagia en levaduras, gracias a su interacción con la proteína ATG8 y ATG11. La proteína Bcl2L13 se encuentra localizada en la membrana mitocondrial externa a través de un dominio transmembrana. Una serie de experimentos, como el sistema de doble híbrido en levadura demostraron que esta proteína interacciona con LC3B. Así mismo estudios de mutagénesis dirigida permitieron identificar una región de interacción con LC3. Aunque el mecanismo detallado de cómo esta proteína media la mitofagia no se conoce completamente, se presume que Bcl2L13 recluta LC3 a la superficie de la

mitocondria, dando lugar a la formación de los mitofagosomas (Otsu, Murakawa, & Yamaguchi, 2015).

La proteína FUNDC1 contiene tres dominios transmembrana y un motivo citosólico LIR. A diferencia de lo que sucede con NIX y BNIP3, la expresión de FUNDC1 no se encuentra alterada sustancialmente durante la hipoxia o eventos de despolarización mitocondrial. En condiciones basales, la interacción entre LC3 y FUNDC1 se encuentra inhibida debido a la fosforilación de residuos localizados muy próximos a su motivo peptídico LIR (Liu et al., 2012; Zhang et al., 2013). Sin embargo, en condiciones de hipoxia o pérdida del potencial de membrana ocurre la desfosforilación de FUNDC1 en el residuo serina 13 por la fosfatasa serina/treonina PGAM5 (phosphoglycerate mutase family member 5). Este evento incrementa su afinidad por LC3 y facilita el anclaje de las mitocondrias en los autofagosomas (Liu, Sakakibara, Chen, & Okamoto, 2014; Wu et al., 2014).

Es importante destacar que BNIP3 al igual que FUNDC1 son considerados los principales mediadores de la mitofagia inducida por hipoxia (Hamacher-Brady & Brady, 2016b).

Adicionalmente, hace algunos años se identificó un tipo inusual de mitofagia debido a la utilización de agentes quelantes de hierro intracelular, sin embargo el mecanismo involucrado no ha sido elucidado hasta la fecha (Allen, Toth, James, & Ganley, 2013).

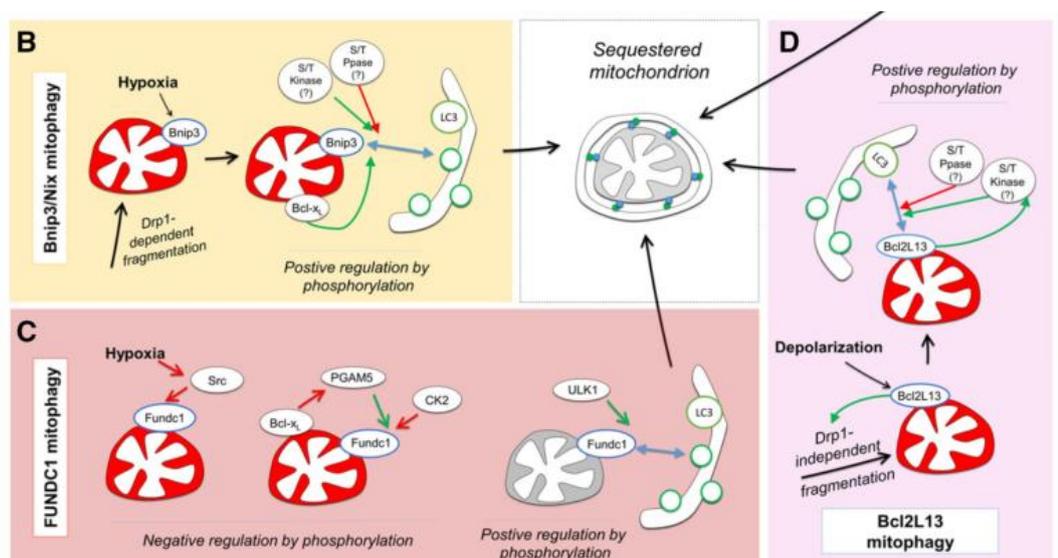


Figura 8. Esquema del mecanismo de los receptores localizados en la membrana externa, a) BNIP3/NIX, b) FUNDC1, c) Bcl2L13. Adaptado de (Hamacher-Brady & Brady, 2016b).

c) Mitofagia inducida por PINK1/Parkin

En la actualidad, el sistema mitofágico mejor entendido se encuentra controlado por la quinasa serina/treonina PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) y la ubiquitina E3 ligasa Parkin.

i) PINK1

PINK1 es una proteína conformada por 581 aminoácidos. En su porción N-terminal presenta una secuencia de orientación a la mitocondria (MTS) comúnmente presente en las pre-proteínas destinadas a la matriz o la membrana interna. Además posee un dominio transmembrana (TMD) seguido de un dominio serina/treonina quinasa (Rüb, Wilkening, & Voos, 2016a; Voigt, Berlemann, & Winklhofer, 2016).

Durante mucho tiempo la localización submitocondrial de PINK1 fue controversial, pero a día de hoy se reconoce que PINK1 es importado a las mitocondrias a través de los complejos TOM y TIM23 en la membrana mitocondrial externa e interna, respectivamente. Cabe destacar que la inserción a través de TIM23 es dependiente del potencial de membrana mitocondrial. Una vez que PINK1 alcanza la matriz es procesada por una peptidasa (MPP, matrix-processing peptidase) que remueve la secuencia MTS. Posteriormente la proteasa PARL (presenilin-associated rhomboid-like protease), localizada en la membrana mitocondrial interna, recorta PINK1 entre los aminoácidos alanina 103 y fenilalanina 104, concretamente en la porción hidrofóbica del dominio transmembrana. Finalmente la proteína resultante de 52kDa es liberada al citosol donde rápidamente es degradada por el proteasoma siguiendo la regla del N-terminal.

La vida media de una proteína citoplasmática depende en gran medida de su residuo amino terminal. A esta dependencia se le denomina regla del N-terminal. Así por ejemplo, una proteína de levadura con metionina en su extremo N-terminal normalmente tiene una vida media superior a 20 horas, mientras que si tiene arginina en esta posición su vida media es de unos dos minutos. Los residuos N-terminales muy desestabilizadores como la arginina o la leucina favorecen la rápida ubiquitinación, mientras que los residuos estabilizadores como la metionina

o la prolina no lo hacen. Además, cabe señalar que las enzimas E3 son los lectores de los residuos N-terminales (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2008) .

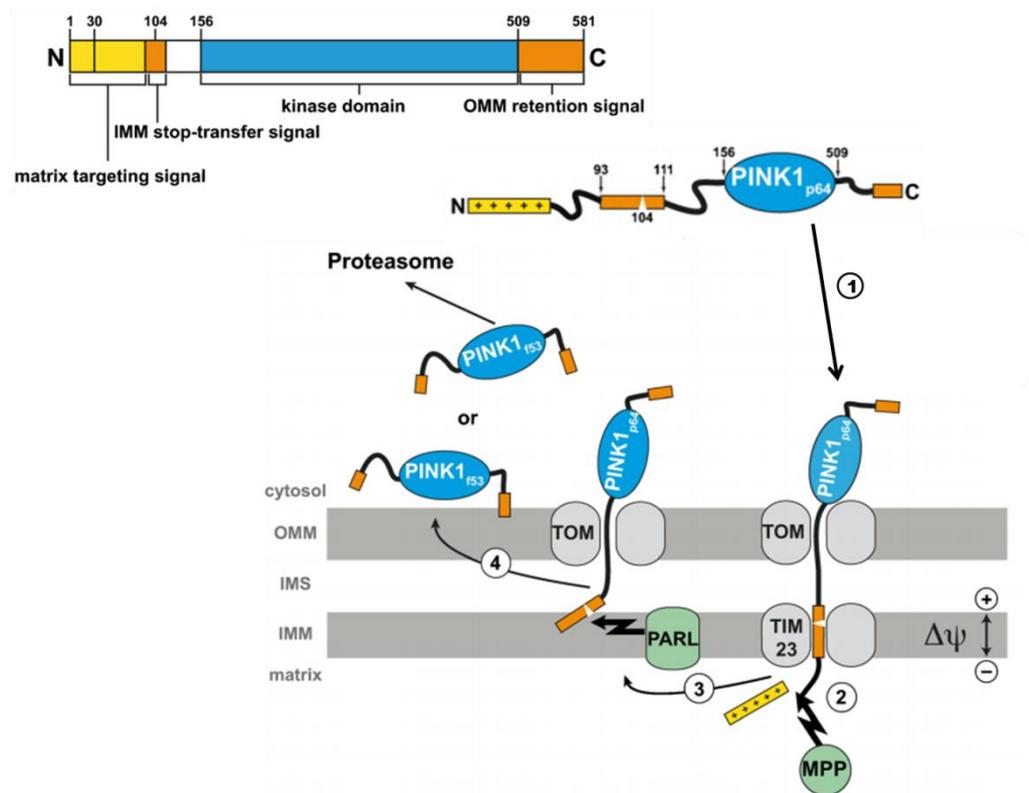


Figura 9. PINK1, a) Representación esquemática de la arquitectura del dominio de PINK1, b) Modelo del importe y procesamiento de PINK1. Adaptado de (Rüb, Wilkening, & Voos, 2016b).

Exactamente como se había indicado antes, un desequilibrio en el potencial de membrana interfiere el importe de PINK1 a través del complejo TIM23 y dirige la proteína hacia la membrana mitocondrial externa, gracias a una señal de orientación comprendida entre los aminoácidos 34 y 90. En la membrana externa, PINK1 se acumula e interactúa con una pequeña subunidad del complejo TOM, la proteína TOMM7 que se ha demostrado como esencial para la estabilización de PINK1 en la MME (Hasson et al., 2013). Seguidamente, la proteína quinasa se dimeriza y se activa por autofosforilación (Kondapalli et al., 2012; Okatsu et al., 2012; Rüb, Wilkening, & Voos, 2016; Voigt et al., 2016).

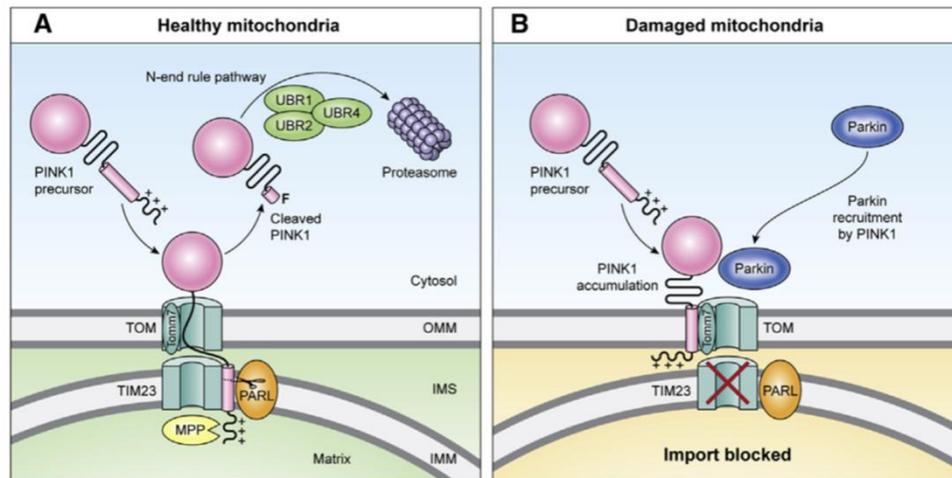


Figura 10. Mecanismos de importe de PINK1, a) en condiciones normales, b) cuando la mitocondria se encuentra despolarizada (Pickrell et al., 2015).

ii) Parkin

La ubiquitinación es una modificación postraslacional utilizada para marcar a las proteínas, para su posterior degradación a través de la unión covalente de la ubiquitina y cadenas ubiquitiladas a residuos de lisina o grupos amino N-terminal de un sustrato proteico. Además de la degradación a través de proteasoma, la ubiquitinación puede ser utilizada como una señal para la autofagia así como también para otros procesos (Kirkin, McEwan, Novak, & Dikic, 2009; Komander & Rape, 2012; Prakash, Inobe, Hatch, & Matouschek, 2009).

El mecanismo de ubiquitinación ocurre a través de la acción secuencial de tres enzimas: E1 de activación, E2 de conjugación y E3 de ligación. La primera reacción utiliza ATP para activar la ubiquitina, en esta etapa se forman un enlace tioéster entre la cisteína catalítica de E1 y el grupo carboxilo terminal de la ubiquitina. A continuación, la ubiquitina es transferida a una segunda cisteína en E2. Finalmente la enzima E2 unida a ubiquitina interactúa con una E3 ligasa específica y transfiere la ubiquitina al grupo amino del sustrato correspondiente (Herhaus & Dikic, 2015; Spratt, Walden, & Shaw, 2014; Winklhofer, 2014a).

De acuerdo a consideraciones estructurales y químicas, existen tres clases de E3 ligasas: las ligasas tipo RING (Really Interesting New Gene), las cuales también incluyen las U-box ligasas, las ligasas tipo HECT (homologous with E6-associated protein C-terminus) y las RBR (RING Between RING) ligasas (Metzger, Hristova, &

Weissman, 2012; Smit, Sixma, Irp, & Ring, 2014; Spratt et al., 2014; Winklhofer, 2014b).

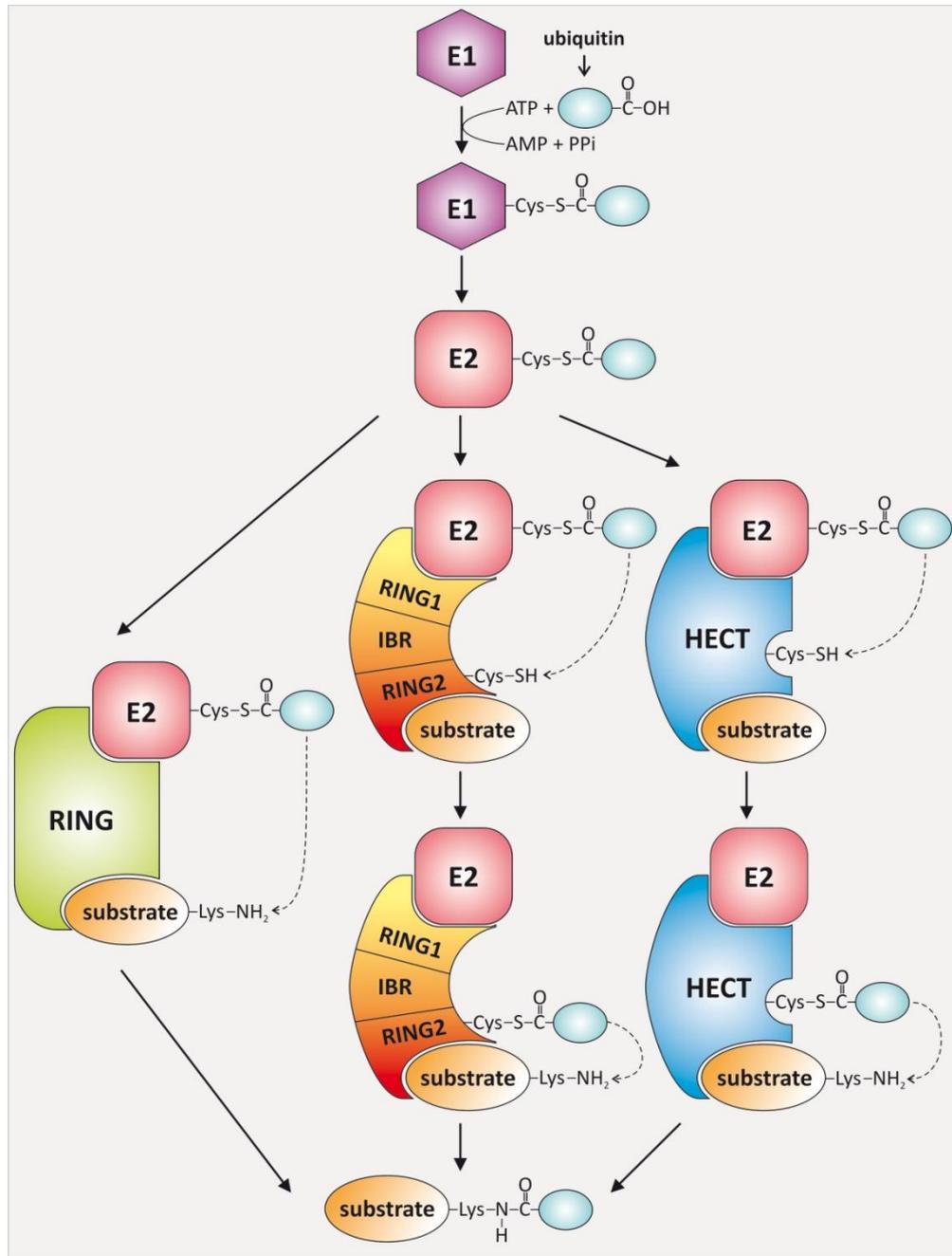


Figura 11. Mecanismo de ubiquitinación. El proceso de ubiquitinación se lleva a cabo a través de 3 enzimas, E1, E2 y E3. En el caso de E3 existen cientos de proteínas que de acuerdo a su estructura y mecanismo se clasifican en E3 tipo RING, E3 tipo RBR y E3 tipo HECT. Obsérvese en el esquema que las proteínas ligasas RBR forma un complejo intermedio con la ubiquitina antes de transferirlo al sustrato, este mecanismo también ocurre con las E3 ligasas HECT (Winklhofer, 2014b).

Parkin pertenece a la familia de RBR ligasas, las cuales son mecanísticamente diferentes a las ligasas de tipo RING pero similares a las ligasas de tipo HECT. En efecto, las RBR ligasas forman un complejo intermediario, donde participa una

cisteína para formar un enlace tioéster transitorio con la ubiquitina antes de transferirla al sustrato. Habitualmente, esta familia de enzimas se encuentra estructuralmente autoinhibida y requiere de un mecanismo de activación para llevar a cabo su actividad E3 (Smit et al., 2014; Spratt et al., 2014; Winklhofer, 2014b).

Parkin es una proteína de 465 aminoácidos, contiene un dominio N-terminal UBL (ubiquitin like) que se asemeja estructuralmente con la ubiquitina y 4 dominios de coordinación con zinc, llamados RING0, RING1, IBR y RING2. El dominio UBL inhibe la actividad ubiquitina ligasa de Parkin a través de interacciones iónicas e hidrofóbicas que bloquean el sitio de reconocimiento para E2. Además este dominio está involucrado en el reconocimiento del sustrato y dominios UIM (ubiquitin interacting motif). Durante la ubiquitinación, las enzimas E2 se unen a RING1 y transfieren la ubiquitina a la cisteína catalítica (C431) localizada en RING2 para formar el enlace tioéster intermediario (Koyano & Matsuda, 2015; Nguyen et al., 2016; Rüb et al., 2016; Trempe et al., 2013; Koji Yamano et al., 2016).

Normalmente en el citosol, Parkin permanece inactivo y adopta una conformación autoinhibida. En esta conformación, el dominio UBL de Parkin y un elemento represor (REP), localizado entre IBR y RING2, bloquean el sitio de unión a E2 en RING1 y la cisteína catalítica C431 en RING2 es bloqueada por RING0. En cambio, cuando ocurre daño mitocondrial, Parkin sufre cambios estéricos que relajan el dominio RING1 y REP, de tal manera que C431 puede ser expuesto, es entonces cuando Parkin es convertido en una E3 ligasa activa (Kumar et al., 2015; Nguyen et al., 2016; Walden & Martinez-Torres, 2012; Winklhofer, 2014b; Koji Yamano et al., 2016).

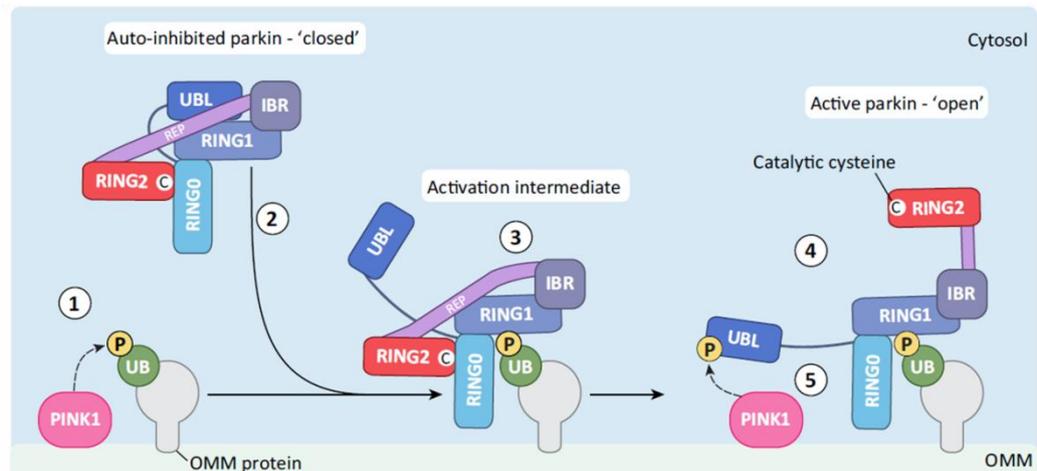


Figura 12. Esquema del mecanismo de activación de Parkin mediado por PINK1 (Nguyen et al., 2016).

Los estudios realizados para determinar la activación de Parkin propusieron a PINK1 como la proteína responsable, a través de la fosforilación del residuo serina 65 en el dominio UBL (Shiba-Fukushima et al., 2012). Es así entonces que se planteó la acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial externa como el factor desencadenante del reclutamiento y activación de Parkin (Iguchi et al., 2013; Kondapalli et al., 2012). Sin embargo, estudios de inhibición de la fosforilación, utilizando un mutante de S65 (S por A) o la delección del dominio UBL, no impidieron el reclutamiento y activación de Parkin. Estos hallazgos indicaron la existencia de otro sustrato de PINK1, necesario para impulsar la actividad ligasa de Parkin (Kane et al., 2014; Agne Kazlauskaitė et al., 2014; Koyano et al., 2014a; Nguyen et al., 2016; Koji Yamano et al., 2016). La ubiquitina, resultó ser el otro sustrato fosforilado por PINK1, en la misma posición que el dominio UBL de Parkin, serina 65 (Kane et al., 2014; Agne Kazlauskaitė et al., 2014; Koyano et al., 2014b). La ubiquitina fosforilada en S65 (UbP-S65) es la responsable de la activación de Parkin tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*, y es fundamental para promover la translocación de esta proteína ligasa a las mitocondrias (Nguyen et al., 2016; Koji Yamano et al., 2016).

iii) Mecanismo de la mitofagia mediada por PINK1/Parkin

Tras su acumulación en la mitocondria despolarizada, PINK1 fosforila a la ubiquitina basal, presente en las proteínas de la MME. Debido a su alta afinidad por UbP-S65, Parkin es reclutado desde el citosol hasta la mitocondria (Koyano et al., 2014a; Ordureau et al., 2014; Shiba-Fukushima et al., 2014). En este lugar, Parkin se une a la UbP-S65 gracias a la formación de un sitio de interacción

conformado por residuos aminoácidos de los dominios RING0, IBR y RING1(A. Kazlauskaitė et al., 2015; Sauve et al., 2015). Una vez unido a Parkin, la UbP-S65 induce un cambio en la estructura de la ligasa, el desplazamiento del dominio inhibidor UBL y el dominio REP permiten la apertura o activación de Parkin (Kumar et al., 2015; Sauve et al., 2015; Wauer, Simicek, Schubert, & Komander, 2015). Asimismo, el desplazamiento del dominio UBL también promueve la fosforilación en S65 por PINK1, lo cual estabiliza aún más la conformación activa de Parkin y promueve la interacción con UbP-S65 (A. Kazlauskaitė et al., 2015; Nguyen et al., 2016; Sauve et al., 2015; Wauer et al., 2015) .

Exactamente como se indicó en un apartado anterior, la conformación activa de Parkin libera al dominio RING1, de tal manera que se encuentra disponible para unirse a E2. Además permite la exposición de RING2 para la formación del enlace tioéster entre el residuo C431 y la ubiquitina. Una vez que se encuentra totalmente activado, Parkin participa en la conjugación de ubiquitina a las proteínas de la membrana externa mitocondrial, lo cual proporciona más moléculas de ubiquitina para ser fosforiladas por PINK1, a su vez da lugar a un incremento del reclutamiento y activación de Parkin. En resumen, este flujo de retroalimentación positiva, permite una translocación rápida y robusta de Parkin a las mitocondrias dañadas (Nguyen et al., 2016; Koji Yamano et al., 2016).

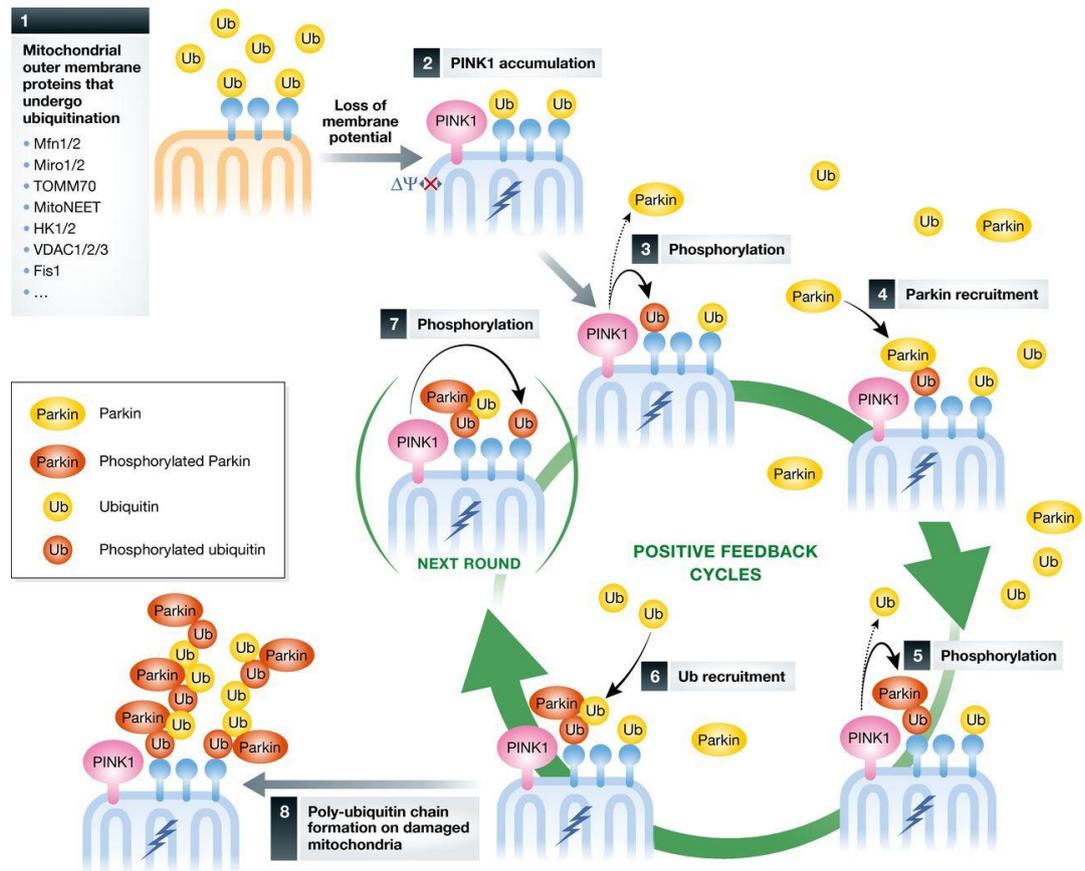


Figura 13. Ciclos de ubiquitinación y retroalimentación positiva inducidos por Parkin y formación de cadenas ubiquitiladas en las mitocondrias dañadas. 1) Se presume que una fracción de ubiquitina reside en la membrana externa de las mitocondrias. 2) Debido a la despolarización de la membrana PINK1 se acumula en la membrana externa. 3) PINK1 luego fosforila a la ubiquitina que se encuentra conjugada a las proteínas mitocondriales o puede fosforilar a Parkin citosólico en la posición del aminoácido S65. 4) Debido a la gran afinidad con la ubiquitina fosforilada, Parkin es reclutado y retenido en la mitocondria. 5) PINK1 fosforila a la mitocondria, además PINK1 puede fosforilar a la ubiquitina citosólica. 6) Parkin activado permite el reclutamiento de más unidades de ubiquitina. 7) Se produce la fosforilación de otras moléculas de ubiquitina y 8) la formación de cadenas poliubiquitinadas sobre la mitocondria dañada (K. Yamano, Matsuda, & Tanaka, 2016).

La actividad conjunta de PINK1 y Parkin da como resultado la poliubiquitinación de proteínas de la membrana externa mitocondrial. En la célula en general, la ubiquitina puede formar diferentes cadenas poliubiquitinadas, estas cadenas difieren en el tipo de residuo de lisina (K) involucrado en la formación de la cadena, dado que la ubiquitina tiene siete residuos de lisina que pueden servir como puntos de poliubiquitinación, es posible encontrar cadenas K48, K63, K6, K11, K27, K29 y K33. Asimismo, el tipo de cadena involucrada determina el destino del sustrato, por ejemplo, la formación de cadenas K48 es la principal señal para la degradación de los sustratos por el proteasoma, mientras que K63 es una señal para la activación de diferentes vías de señalización, entre las cuales se encuentra

la autofagia (Herhaus & Dikic, 2015). En la mitocondria, la cuantificación de todas las cadenas de ubiquitina muestra que Parkin forma predominantemente cadenas K48 y K63, además de cantidades significativas de K6 y K11 (Nguyen et al., 2016; Ordureau et al., 2014).

Se ha demostrado que la cadena K48 y probablemente también K11 desempeñan un rol permisivo de la mitofagia, promoviendo la extracción de sustratos de la membrana mitocondrial externa y su degradación posterior por el proteasoma. Así por ejemplo, las proteínas involucradas en la fusión mitocondrial, mitofusina 1 y mitofusina 2, son altamente susceptibles a la ubiquitinación de Parkin y posteriormente son rápidamente degradadas, evitando así la fusión de las mitocondrias dañadas con la población sana. Parkin, además promueve la segregación de las mitocondrias dañadas al marcar a la proteína de transporte mitocondrial, Miro, para su degradación (Ordureau et al., 2014; Tanaka et al., 2010; Yoshii, Kishi, Ishihara, & Mizushima, 2011).

Se cree que el principal rol de las cadenas K63 en la mitofagia dependiente de PINK1/Parkin es el reclutamiento de receptores autofágicos. Tal como se indicó en una sección previa, estas proteínas se unen simultáneamente a ubiquitina a través de un dominio de unión a ubiquitina y a las proteínas de la familia ATG8 presentes en la membrana del autofagosoma, gracias al motivo peptídico LIR (Stolz et al., 2014a; Wild et al., 2014). Cinco diferentes tipos de receptores autofágicos se trasladan a la mitocondria durante la mitofagia mediada por PINK1/Parkin: Optineurina, NDP52, p62, NBR1 y TAX1BP1 (Tax1-binding protein 1) (Lazarou et al., 2015). De todos ellos, Optineurina y NDP52 son los principales, pero funcionalmente redundantes (Lazarou et al., 2015). TAX1BP1 también es importante pero en menor grado (Heo, Ordureau, Paulo, Rinehart, & Harper, 2015; Lazarou et al., 2015). A pesar de ser funcionalmente redundantes, NDP52 y Optineurina tienen una distribución desigual en tejidos y por lo tanto podrían funcionar en mayor o menor grado dependiendo del tipo de tejido implicado.

El modelo establecido de la función de los receptores autofágicos durante la mitofagia dependiente de PINK1/Parkin reconocía el reclutamiento del fagóforo o membrana de aislamiento asociada a LC3/GABARAP a la mitocondria ubiquitilada. Sin embargo, el estudio de Itakura *et al.* (2012) cambio este modelo demostrando

que la membrana de aislamiento pre-formada no es reclutada a la mitocondria, en lugar de esto, son construidas en la membrana mitocondrial externa. Siguiendo la activación de PINK1/Parkin, las proteínas ULK1 y ATG9A son reclutadas de manera independiente a la superficie de la mitocondria para iniciar la formación del autofagosoma. Aunque el mecanismo exacto de reclutamiento de estas proteínas aún no ha sido dilucidado, se ha demostrado que Optineurina y NDP52 son las proteínas involucradas en este proceso, no así p62 ni NBR1. LC3/GABARAP son reclutados posteriormente por los receptores autofagicos, durante las últimas etapas de la autofagia y probablemente su función es promover la expansión y cierre de los autofagosomas (Itakura, Kishi-Itakura, Koyama-Honda, & Mizushima, 2012; Lazarou et al., 2015; Nguyen et al., 2016).

3) TP53INP2 / DOR

El gen TP53INP2 también denominado DOR (Diabetes and Obesity Regulated) fue descubierto en el laboratorio del Dr. Antonio Zorzano. El estudio de la identificación de nuevos genes involucrados en la patofisiología de la diabetes mellitus de tipo 2 y la obesidad en ratas, identificó que *TP53INP2* estaba altamente reprimido en músculo esquelético (Baumgartner et al., 2007). Este mismo resultado se halló en muestras de músculo provenientes de pacientes obesos o con diabetes tipo 2 (Baumgartner et al., 2007). Estudios posteriores de caracterización de la expresión de la proteína permitieron determinar que TP53INP2 se encuentra altamente expresado en músculo esquelético, corazón, cerebro y en menor proporción en tejido adiposo (Baumgartner et al., 2007).

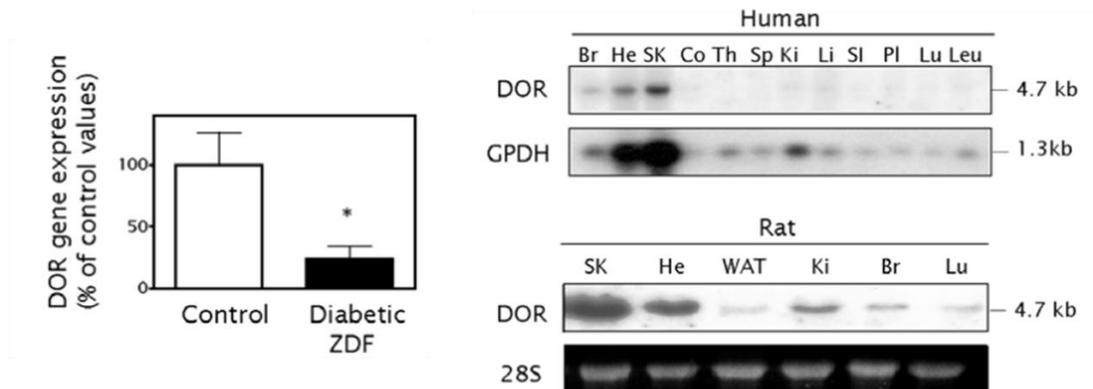


Figura 14. Expresión de TP53INp2. a) Expresión de TP53INP2 en músculo esquelético de ratas ZDB, obsérvese una reducción del 77% de expresión. b) expresión de RNA mensajero de TP53INP2 en dos modelos, rata y humano (Baumgartner et al., 2007).

El estudio filogenético de la proteína TP53INP2 demostró que se encuentra muy bien conservada en las especies investigadas: rata, ratón y humano. En cuanto a la homología entre estas especies, se determinó que existe un 84% entre humano y ratón, un 83% entre humano y rata y un 85% entre ratón y rata. Adicionalmente, la proteína codificada en humanos presenta 220 residuos y en el caso de las otras dos especies 221 aminoácidos. Por otra parte, el único homólogo descrito en humanos hasta la fecha es un regulador de la apoptosis dependiente de p53 denominado TP53INP1, SIP, Teap o Stinp, con el cual TP53INP2 comparte una homología en la secuencia de los aminoácidos del 36%. Respecto a la estructura, los análisis bioinformáticos realizados permiten afirmar que la región C-terminal posee una fuerte carga positiva. Esta característica favorecería la formación de una estructura α -hélice

mientras que para el resto de la proteína no se ha podido establecer una conformación definida.

En relación con la función de TP53INP2, los estudios realizados señalan que esta proteína se mueve constantemente del núcleo al citoplasma y dependiendo de su localización ejerce una función determinada.

a) Función nuclear de TP53INP2

Teniendo en cuenta estudios bioinformáticos, así como también la localización nuclear del homólogo de TP53INP2, se estudió la localización subcelular de TP53INP2 en el núcleo. De esta manera se pudo determinar que TP53INP2 se encuentra principalmente en unos cuerpos nucleares denominados PML, del inglés “Promyelocytic leukemia protein” (Baumgartner et al., 2007).

Siguiendo estos mismos análisis se estudió la actividad de esta macromolécula como coactivador de receptores nucleares, es conveniente indicar que estos receptores fueron seleccionados teniendo en cuenta su importancia en los principales tejidos de expresión de TP53INP2, músculo esquelético y tejido adiposo. Es así que, utilizando la expresión de un gen reportero, se determinó que TP53INP2 coactiva de forma dosis dependiente el receptor de hormonas tiroideas α , el receptor de glucocorticoides α (GR α) y el receptor activador de la proliferación de peroxisomas γ (PPAR γ). Otros receptores que también fueron coactivados fueron el receptor de la vitamina D (VDR) y el receptor de estrógenos (ER α). Así mismo se estableció que la función es conducida principalmente por la porción N-terminal de la proteína, mientras que la porción C-terminal exhibe una acción inhibitoria (Baumgartner et al., 2007; Sancho et al., 2012).

Adicionalmente, a través de ensayos de coimmunoprecipitación e inmunoprecipitación de cromatina, se identificó que TP53INP2 se une físicamente a TR α 1, un receptor muy conocido de la hormona tiroidea biológicamente más activa, T3. Cabe indicar que TR α 1 se expresa abundantemente, en tejido cardíaco y músculo esquelético. Por otra parte, la represión de TP53INP2 en un modelo de células musculares (utilizando siRNAs) redujo marcadamente la acción de las hormonas tiroideas y al mismo tiempo ocasionó una alteración en la diferenciación muscular (Baumgartner et al., 2007). Estos resultados son bastante consistentes con el hecho de que la desregulación de TP53INP2 en músculo esquelético tiene un impacto negativo en la miogénesis. Así por

ejemplo, un estudio de sobreexpresión músculo-específico de TP53INP2 demostró una reducción de la masa muscular mientras que el modelo *knockout* de TP53INP2 dio lugar a hipertrofia muscular (Sala et al., 2014).

Así también, en un modelo in vivo de *Drosophila melanogaster* se observó que un homólogo de TP53INP2 actúa como coactivador del receptor de la ecdisoma, un receptor de hormona esteroidea que tiene un papel fundamental durante la metamorfosis (Francis, Zorzano, & Teleman, 2010).

Otra función de TP53INP2 descrita recientemente involucra la localización de esta proteína en el nucléolo. Inicialmente se determinó que TP53INP2 era reclutado fuera del núcleo en respuesta al estrés celular o la activación de la autofagia, a través de la inhibición de mTOR. Sin embargo, algún tiempo después gracias a un estudio de microscopia con células vivas se demostró que TP53INP2 continuamente se desplaza entre el núcleo y el citoplasma atravesando el nucléolo (Mauvezin, Sancho, Ivanova, Palacin, & Zorzano, 2012). Casualmente, otro estudio también localiza a TP53INP2 en el nucléolo gracias al hallazgo de una secuencia de localización nucleolar en la porción C-terminal (Xu et al., 2016). Además en este estudio demuestran con ayuda de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina que TP53INP2 interacciona directamente con el complejo de pre-iniciación de la ARN polimerasa 1 (POLR1), esta nueva función descubierta resalta el rol de TP53INP2 en la biogénesis ribosómica como promotor de la transcripción del ADN ribosómico en condiciones de nutrición adecuada (Xu et al., 2016).

b) Papel de TP53INP2 en autofagia

Estudios en condiciones de aumento de autofagia por inhibición de mTOR revelaron que la activación de este proceso conduce a TP53INP2 a los autofagosomas donde se asocia directamente con las proteínas reguladoras clave de la autofagia, las proteínas miembros de la familia ATG8, que participan en la lipidación y elongación del autofagosoma (Mauvezin et al., 2010; Nowak et al., 2009). Esta interacción ocurre a través de un motivo peptídico LIR, presente en TP53INP2, entre los aminoácidos 31 y 43. Coincidentemente, esta región también aloja la secuencia de la señal de transporte fuera del núcleo (NES), entre los aminoácidos 36 y 40. Debido a estas características se deduce fácilmente que esta secuencia se encuentra en una región altamente conservada de la proteína (Sancho et al., 2012).

A pesar de la interacción con LC3, GABARAP, GABARAPL1 y GATE16, TP53INP2 no se localiza en los autofagolisosomas. Por esta razón se afirma que esta proteína participa en etapas previas a la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. Asimismo, el mecanismo de degradación de TP53INP2 a través del proteasoma refuerza esta hipótesis.

Una investigación reciente reportó una interacción previa de TP53INP2 y LC3 en el núcleo, en condiciones de ayuno (Huang et al., 2015). Según los autores, la activación de una desacetilasa por efecto del ayuno de aminoácidos conduce a la desacetilación de LC3 en el núcleo. Esta modificación de LC3 permite que se encuentre disponible para interactuar con TP53INP2, de modo que son reclutados juntos al citosol, donde LC3 puede unirse a ATG7 y otros factores autofágicos para participar en la formación del autofagosoma.

En relación al estudio de la actividad de TP53INP2 en autofagia, se ha demostrado que la sobreexpresión de esta proteína incrementa el número de autofagosomas y acelera la degradación proteica en células HeLa (Mauvezin et al., 2010; Nowak et al., 2009). Por el contrario, la reducción de la expresión de TP53INP2 en un modelo de células musculares reduce la formación de autofagosomas y la degradación proteica (Sala et al., 2014).

Por otra parte, el estudio en un modelo *in vivo* utilizando *Drosophila melanogaster*, también demostró que TP53INP2 participa en la regulación de la autofagia. Normalmente, durante la metamorfosis de esta especie se destruyen, a través de autofagia y muerte celular programada, ciertos tejidos y órganos larvarios para dar lugar a la forma adulta, como las glándulas salivales, los cuerpos grasos, el intestino y los músculos (Neufeld & Baehrecke, 2008). Entre estos tejidos, el cuerpo graso presenta abundante expresión del homólogo de TP53INP2. Por ello se utilizó este tejido para estudiar la autofagia en un modelo *wild type* y en uno *knockout*, el proceso autofágico fue monitorizado a través de un colorante fluorescente responsable de la tinción de los lisosomas. Es así que se demostró una reducción del 40% de lisosomas en un modelo knockdown de dTP53INP2 (Mauvezin et al., 2012).

Igualmente, en los modelos de músculo esquelético de ratones previamente mencionados, se evidenció que TP53INP2 altera la masa muscular a través de la activación de la autofagia (Sala et al., 2014). En este estudio, la sobreexpresión de TP53INP2 mostró una reducción del peso muscular y el tamaño de las miofibras, en cambio, el modelo de ablación presentó el efecto contrario, un incremento en el peso muscular y el tamaño de las miofibras (Sala et al., 2014). Adicionalmente, los autores demostraron, a través de ensayos de coimmunoprecipitación, que TP53INP2 interacciona con ubiquitina y se une preferencialmente a proteínas monoubiquitiladas y proteínas ubiquitiladas vía K63.

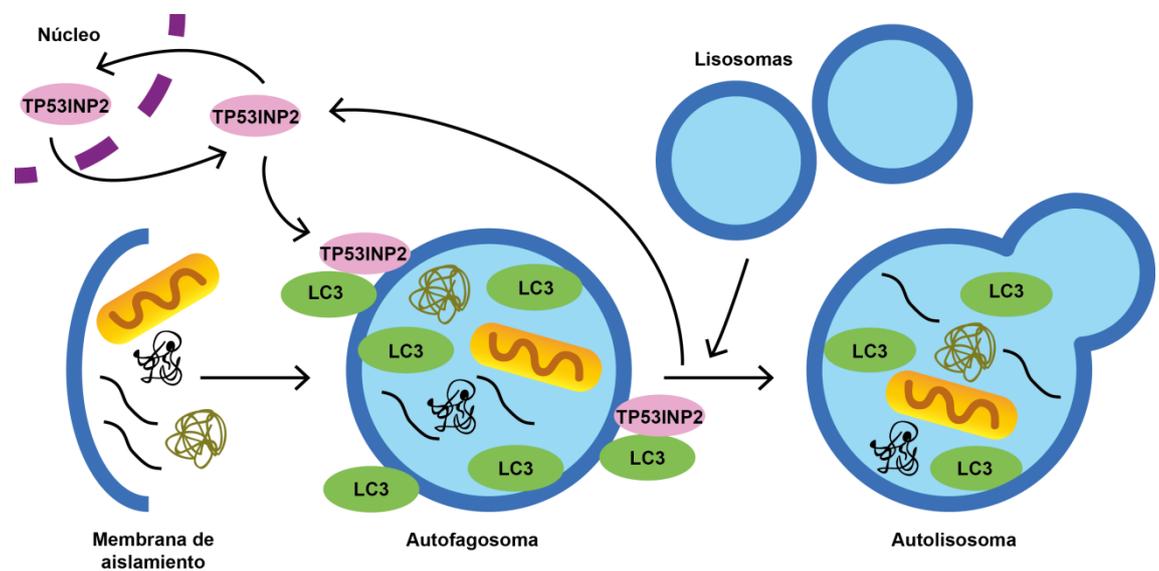


Figura 15. Esquema del mecanismo de TP53INP2/DOR en la autofagia no selectiva.

Capítulo 2. Objetivo del estudio

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Un conjunto de datos nos sugerían que TP53INP2 podía tener un rol en la eliminación de mitocondrias dañadas:

- TP53INP2 es una proteína con actividad estimuladora de la autofagia general (Mauvezin et al., 2010; Nowak et al., 2009).
- Posee un motivo peptídico LIR que le permite interaccionar con proteínas de la familia ATG8 y por tanto con los autofagosomas.
- Se ha demostrado que TP53INP2 puede interaccionar con ubiquitina y proteínas ubiquitiladas. Esta característica y la presencia de un motivo LIR coincide con lo descrito para otras proteínas conocidas como receptores de autofagia, las cuales se han demostrado que participan en varios tipos de autofagia selectiva como por ejemplo la mitofagia.
- Finalmente, una observación preliminar, por parte de la Dra. Saadet Turkseven, que documenta el reclutamiento de la proteína TP53INP2 fuera del núcleo cuando las células son incubadas con un agente despolarizante de la membrana mitocondrial interna mostraron colocalización positiva entre TP53INP2 y mitocondrias.

Tomando en consideración los puntos anteriores se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Demostrar si TP53INP2 juega un papel regulatorio en la biología mitocondrial, para ello se han utilizado células HeLa YFP-Parkin, en las que se ha llevado a cabo la sobreexpresión de TP53INP2 y células L6E9 en las que se silenció parcialmente la expresión de TP53INP2.
- 2) Analizar si TP53INP2 regula la actividad de la autofagia mitocondrial inducida por Parkin. Para ello hemos establecido el método idóneo para el estudio de la autofagia mitocondrial y a continuación hemos explorado si TP53INP2 modula la autofagia mitocondrial.

Capítulo 3. Resultados

3) Estudio de la regulación de la biología mitocondrial por TP53INP2

a) Modelos utilizados

Con el propósito de determinar el efecto de TP53INP2 en la mitocondria, se utilizaron dos modelos celulares, el primero corresponde a las células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin y en el segundo caso se utilizaron los mioblastos de músculo esquelético de rata, L6E9.

Normalmente, las células HeLa expresan niveles endógenos muy bajos de TP53INP2, tal como lo reportó Mauvezin *et al.*, 2010. Bajos niveles de expresión fueron observados en el caso de HeLa YFP-Parkin como se puede apreciar en la Figura 16 A. Por esta razón para trabajar con este modelo celular se optó por sobreexpresar TP53INP2. Además para obtener una alta eficiencia de la expresión de la proteína de interés se utilizó la transducción adenoviral de TP53INP2. Inicialmente se utilizó como control la sobreexpresión de adenovirus LacZ pero debido a que este vector induce una ligera sobreexpresión de TP53INP2 se decidió utilizar otro vector disponible en el laboratorio, por ello se escogió adenovirus GFP.

Paralelamente, se buscó un modelo celular que expresará niveles adecuados de TP53INP2 en el cual se pudiera inducir una represión de la expresión de TP53INP2. Al principio se intentó utilizar células HEK293, sin embargo debido a que el anticuerpo que se tenía en el laboratorio en ese entonces no era muy específico no se podía determinar correctamente por western blot las bandas correspondientes a la proteína TP53INP2. Además tampoco se pudo conseguir la represión de TP53INP2. Alternativamente, se estudió los niveles de expresión de TP53INP2 en un modelo celular disponible en el laboratorio, las células L6E9. Estas células mostraron una expresión mayor de TP53INP2 comparada con las células HeLa YFP-Parkin. Por ello se decidió utilizar este modelo para reprimir la expresión de TP53INP2. Tal como se observa en la Figura 16 B se utilizaron 2 tipos de shRNA para reprimir la expresión, de ellos el denominado Si6 indujo una mayor represión de TP53INP2.

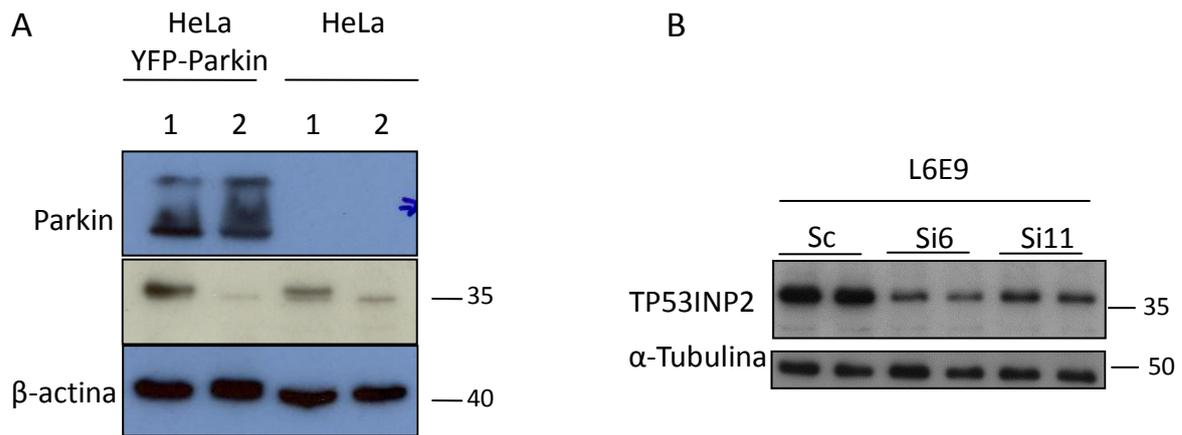


Figura 16. Niveles de expresión de TP53INP2. (A) Las células HeLa YFP-Parkin fueron transducidas con una MOI de 50 adenovirus por célula codificantes para TP53INP2 en 1 y GFP en 2. Las células HeLa transducidas de la misma manera con adenovirus codificantes para TP53INP2 en 1 y GFP en 2. (B) Expresión de TP53INP2 en células L6E9 control (Sc) y knockdown (Si6 y Si11).

Una vez se tuvieron disponibles los modelos celulares se procedió a estudiar diferentes parámetros de la función mitocondrial.

b) Masa mitocondrial

El primer parámetro estudiado fue la masa mitocondrial. Esta característica se determinó utilizando la sonda fluorescente MitoTracker™ Deep Red. La familia de sondas MitoTracker™ son un grupo de colorantes que marcan intensamente las mitocondrias. Cabe destacar que todos estos colorantes son variaciones del compuesto H2-CMXRos. Además, debido a que son altamente permeables, no causan toxicidad y pueden teñir de forma muy fiable las mitocondrias de células en cultivo, se utilizan ampliamente. Respecto al mecanismo exacto de interacción con las mitocondrias, éste no se conoce en su totalidad, pero se cree que estos colorantes al ser moléculas lipófilas catiónicas, se acumulan en las mitocondrias que poseen una carga ligeramente negativa donde se oxidan para dar lugar a un colorante fuertemente fluorescente, CMXRos. El grupo clorometil de las sondas permitiría la unión covalente del colorante con grupos tiol libres de ciertos residuos de cisteína de las proteínas mitocondriales (Dong et al., 2013).

Tras la incubación de las células con la sonda MitoTracker™ Deep Red, la fluorescencia fue analizada a través de la citometría de flujo.

En el caso de las células HeLa YFP-Parkin, tal como se indicó en la sección previa, las células utilizadas como control fueron infectadas con un adenovirus codificante para GFP. En este

modelo, las células que sobreexpresan TP53INP2 mostraron un incremento del 25% de la masa mitocondrial, que es estadísticamente significativo respecto al control (Figura 17).

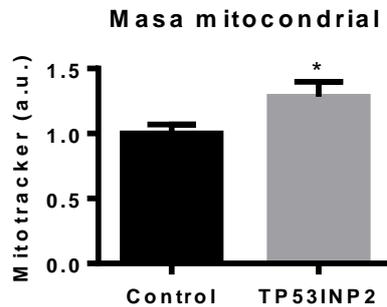


Figura 17. Masa mitocondrial en células HeLa YFP-Parkin que sobreexpresan TP53INP2. Se analizó la masa mitocondrial de células HeLa YFP-Parkin transducidas con adenovirus GFP (control) y TP53INP2 previamente incubadas con la sonda fluorescente MitoTracker™ Deep Red (10 nM) durante 15 minutos a 37°C. El gráfico muestra el promedio y el error estándar del promedio (SEM) correspondientes a 5 experimentos independientes por duplicado. * indica diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,05$ de una prueba t de Student realizada con 2 colas de distribución.

Por el contrario, las células L6E9 con una pérdida de función de TP53INP2 mostraron una ligera disminución, aproximadamente un 12,5%, estadísticamente significativo de la masa mitocondrial respecto al control (Figura 18).

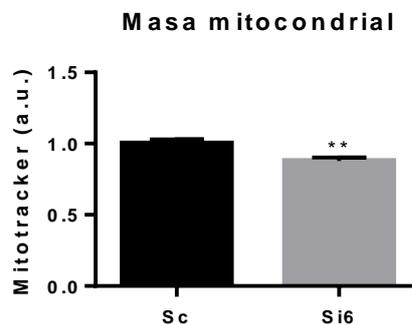


Figura 18. Masa mitocondrial en células L6E9. La masa mitocondrial fue determinada utilizando la sonda MitoTracker™ Deep Red a una concentración de 10 nM durante 15 minutos a 37°C. Las barras muestran la media y el error estándar de la media de 5 experimentos independientes realizados por duplicado. ** indica diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,005$ de una prueba t de Student realizada con 2 colas de distribución.

c) Cuantificación de ADN mitocondrial por PCR en tiempo real

Otra manera de comprobar variaciones en el contenido mitocondrial es a través de la cuantificación del ADN mitocondrial. Como se explicó en el capítulo 1 de esta tesis, el ADN mitocondrial humano es una molécula circular pequeña de 16,569 pares de bases que contiene información para genes que codifican 22 tRNA, 2 rRNA y 13 polipéptidos que forman parte de las subunidades proteicas de la cadena de transporte de electrones. Por

otra parte las proteínas involucradas en la replicación, transcripción, traducción y reparación del ADN mitocondrial son codificadas por el ADN nuclear.

En esta tesis, el contenido del ADN mitocondrial proveniente de muestras de ADN purificado fue calculado a través de un método de cuantificación relativa, utilizando el método de comparación de Ct, a través del cual se calculó el número de copias de ADN mitocondrial respecto a la cantidad de ADN nuclear.

El ADN analizado fue obtenido a partir de células HeLa YFP-Parkin previamente transducidas con adenovirus que codifican para GFP y TP53INP2. Utilizando “primers” específicos se amplificaron los genes *Cox2* y *β-actina* codificantes para el genoma mitocondrial y nuclear respectivamente. Como se puede observar en la Figura 19, no se observan diferencias significativas en la proporción mtDNA / nDNA, indicando que la expresión de TP53INP2 en células HeLa YFP-Parkin no modifica la cantidad de mitocondrias.

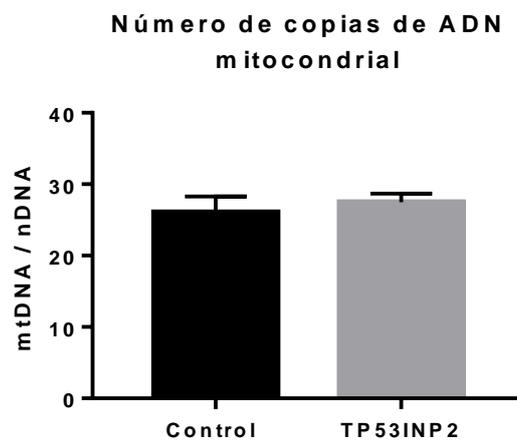


Figura 19. Cuantificación del ADN mitocondrial mediante PCR en tiempo real en células HeLa YFP-Parkin. Las células HeLa YFP-Parkin fueron transducidas con 50 virus por célula de los adenovirus que codifican para GFP (control, barra negra) y TP53INP2 (barra gris). El ADN total fue extraído 48 horas después de la transducción. Mediante PCR de tiempo real se amplificó el gen mitocondrial COXII y el gen nuclear β -actina. Las barras muestran la media y el error estándar de la media de 8 experimentos independientes realizados por triplicado, de los niveles del gen mitocondrial relativo al gen nuclear.

Respecto a las células L6E9, el ADN purificado fue amplificado utilizando “primers” específicos para una secuencia del genoma mitocondrial y el gen *Pde4* del genoma nuclear. Es importante indicar que la secuencia de estos primers fueron obtenidos a partir de (Gonzalez-Hunt et al., 2016). En la Figura 20 se presenta la proporción de mtDNA / nDNA

hallados en las células L6E9 control y “knockdown” de TP53INP2, como se puede apreciar no se observan diferencias significativas.

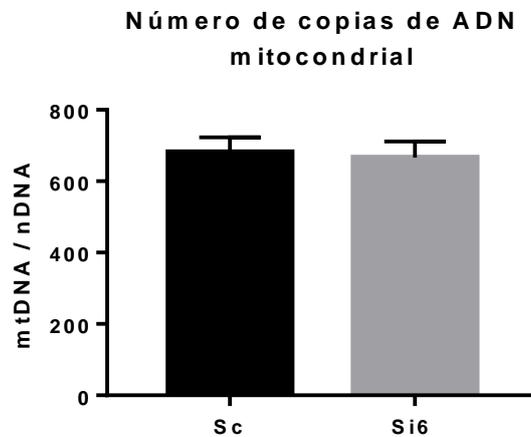


Figura 20. Cuantificación del ADN mitocondrial mediante PCR en tiempo real en células L6E9. El ADN extraído de las células L6E9 fue amplificado mediante PCR utilizando secuencias específicas para el genoma mitocondrial y nuclear de rata (Gonzalez-Hunt et al., 2016). Las barras muestran el promedio y el error estándar del promedio del control (barra negra) y del modelo de pérdida de función de TP53INP2 (barra gris), de los niveles del gen mitocondrial relativo al gen nuclear. Los resultados mostrados en esta figura corresponden a 8 experimentos independientes realizados por triplicado.

d) Potencial de membrana mitocondrial (Ψ)

La mitocondria, como la principal fuente de energía de la célula, produce ATP utilizando la energía potencial del gradiente electroquímico de protones, conocida también como fuerza protón motriz. La transferencia de electrones a través de los complejos proteicos I-IV en la membrana mitocondrial interna suministra la energía para conducir los protones (H^+) contra un gradiente de concentración a través de la membrana interna. Esto resulta en una acumulación de H^+ fuera de la membrana, los cuales posteriormente regresan a la mitocondria a través de la ATP sintasa y finalmente se produce la síntesis de ATP. La fuerza total que impulsa los protones hacia la mitocondria (es decir, Δp), es una combinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$, una carga o gradiente eléctrico) y el gradiente de pH mitocondrial (ΔpH_m , H^+ o un gradiente de concentración) (Perry, Norman, Barbieri, Brown, & Gelbard, 2011). De esto, se deduce la importancia del potencial de membrana como un parámetro crítico para establecer la función normal de las mitocondrias.

Al igual que la masa mitocondrial, este parámetro fue determinado utilizando una sonda fluorescente denominada TMRM (éster metílico tetrametilrodamina). Este colorante se utiliza ampliamente para la tinción, la medida del potencial de membrana y por consiguiente el estudio de la funcionalidad de las mitocondrias en las células vivas. Debido a que es bastante permeable y posee una carga positiva, es fácilmente incorporado hacia el interior de las mitocondrias, que normalmente poseen una carga negativa. No obstante, debido a que los cambios en el potencial de membrana plasmática también pueden influir en su localización es necesario utilizar además un compuesto desacoplante de la membrana mitocondrial para establecer correctamente el potencial de membrana mitocondrial.

Después de la incubación con los compuestos correspondientes (TMRM y el agente desacoplante), la fluorescencia fue analizada a través de citometría de flujo. Finalmente, debido a que el potencial de membrana depende de la cantidad de mitocondrias presentes en las células, los resultados obtenidos en cada modelo fueron corregidos por la masa mitocondrial.

Las células HeLa YFP-Parkin transducidas previamente (48h antes) con adenovirus codificantes para GFP y TP53INP2 fueron incubadas con TMRM y CCCP tal como se indica en la sección 2.5.2 del capítulo de Materiales y Métodos. El análisis de los resultados obtenidos se presenta en la Figura 21. Así como se observa, las células que sobreexpresan TP53INP2 mostraron una disminución estadísticamente significativa del potencial de membrana respecto al control (Figura 21).

Potencial de membrana mitocondrial

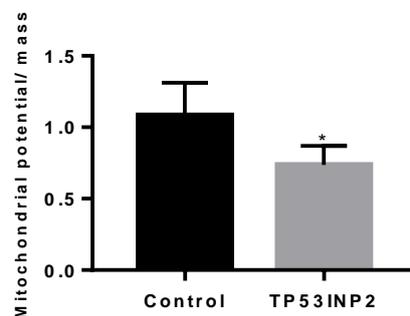


Figura 21. Efecto de la sobreexpresión de TP53INP2 en el potencial de la membrana mitocondrial (Ψ) en células HeLa YFP-Parkin. Las células fueron incubadas con TMRM 200 nM y CCCP 50 μ M más TMRM 200 nM. El potencial de membrana mitocondrial fue determinado al restar los valores de fluorescencia de las células incubadas con CCCP y TMRM de los de las células incubadas únicamente con TMRM. Posteriormente estos valores fueron normalizados utilizando el promedio de la masa mitocondrial. Las barras muestran el promedio

y el error estándar del promedio (SEM) de 3 experimentos independientes por duplicado. * indica diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,05$ de una prueba t de Student realizada con 2 colas de distribución.

En cuanto al modelo de pérdida de función de TP53INP2, estas células también mostraron una disminución del potencial de membrana (Figura 22).

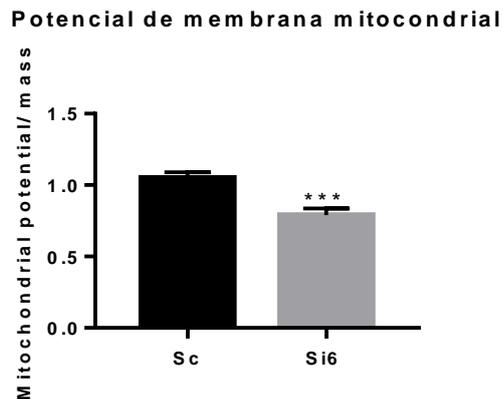


Figura 22. Potencial de membrana mitocondrial corregido en células L6E9. Al igual que el modelo anterior, estas células fueron incubadas con TMRM 200 nM y CCCP 50 μ M más TMRM 200 nM. El potencial de membrana mitocondrial fue determinado de la misma manera y normalizado con el promedio de la masa mitocondrial. Las barras muestra el promedio y el error estándar del promedio (SEM) de 3 experimentos independientes por duplicado. *** indica diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,0005$ de una prueba t de Student realizada con 2 colas de distribución.

e) Estrés oxidativo

Debido a los resultados obtenidos en el análisis del potencial de membrana de los modelos de sobreexpresión y pérdida de función de TP53INP2, que parecen indicar una alteración a nivel del transporte de electrones en la cadena respiratoria, se decidió estudiar los niveles de ROS en ambos modelos.

A menudo, las mitocondrias son consideradas como una de las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno en las células. Aunque existen diferentes sitios de producción de ROS en las mitocondrias, los dos sitios más extensamente estudiados corresponden a los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones. Otras fuentes documentadas de producción de ROS en la mitocondria corresponden a las enzimas monoamino oxidasa y la dihidroorotato deshidrogenasa, localizadas en la membrana externa, así como algunas

flavoproteínas (Wojtala et al., 2014). Es conveniente indicar que las mitocondrias no son el único lugar de producción intracelular de ROS.

Para estudiar ambos modelos en condiciones de estrés oxidativo se utilizó la sonda MitoSOX™ Red. Esta sonda es un colorante usado para medir la producción de superóxido en la matriz mitocondrial. MitoSOX™ Red es un derivado catiónico de DHE (dihidroetidio), por ello al igual que esta molécula reacciona con el anión superóxido, sin embargo esta reacción ocurre de una manera mucho más rápida que con DHE. Gracias a la carga positiva del sustituyente trifenilfosfonio, MitoSOX™ es fácilmente reclutado a la mitocondria donde es oxidado por el anión superóxido para formar un compuesto fluorescente (2-hidroxi-etidio).

Asimismo, para inducir el estrés oxidativo se utilizó un compuesto inhibidor de la transferencia de electrones en el complejo III de la cadena respiratoria, la Antimicina A. El complejo III, conocido también como ubiquinol-citocromo c reductasa, cataliza la reducción del citocromo c mediante la oxidación del ubiquinol y el bombeo de 4 protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. En este proceso se realiza la transferencia de 2 electrones desde el ubiquinol hacia el aceptor final, el citocromo c. La Antimicina A se une en el sitio donde normalmente se une el ubiquinol y donde ocurre la transferencia de electrones al oxígeno que se encuentra unido a una enzima adyacente que contiene hierro. Debido al bloqueo causado por la Antimicina A, no se produce la transferencia de electrones y por lo tanto el oxígeno unido a la enzima adyacente se convierte en superóxido.

En condiciones basales, como se puede apreciar en la Figura 23, el modelo de sobreexpresión de las células HeLa YFP-Parkin presenta un incremento muy pequeño de los niveles de ROS que no es significativo. Sin embargo, cuando las células son incubadas con Antimicina A se encontró un incremento importante de los niveles de ROS.

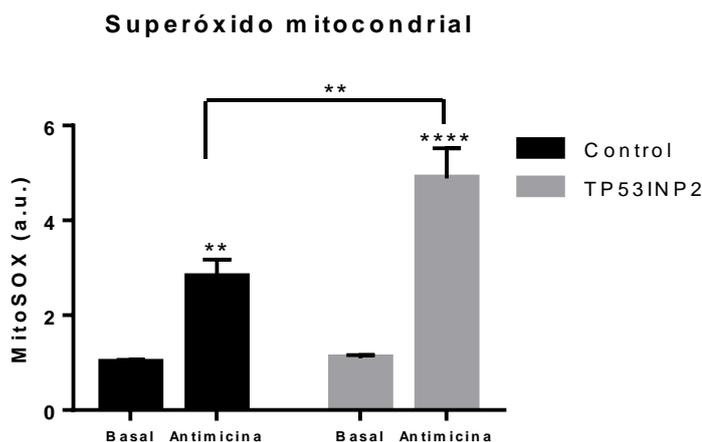


Figura 23. Producción de superóxido en condiciones de estrés oxidativo en células HeLa YFP-Parkin. Las células fueron incubadas con 50 μM de Antimicina y posteriormente con 2,5 μM de la sonda MitoSOXTM. Las barras muestra la media y el error estándar del promedio (SEM) de 4 experimentos independientes por duplicado. ** y **** indica diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,005$ y $p < 0,00005$ de una prueba t de Student realizada con 2 colas de distribución.

En el caso de las células de las células L6E9, éstas mostraron ser resistentes al estrés oxidativo inducido por Rotenona (inhibidor del complejo I). Posteriormente cuando se utilizó Antimicina A, también mostraron ser menos susceptibles a la producción de ROS, a diferencia del otro modelo celular. Aparentemente, tal como se muestra en la Figura 24, parece haber una disminución de los niveles de ROS en condiciones basales y en aquellas tratadas con Antimicina A. No obstante, estos resultados no son significativos por lo que se concluye que no existe diferencia entre las células que expresan TP53INP2 y las células con pérdida de función.

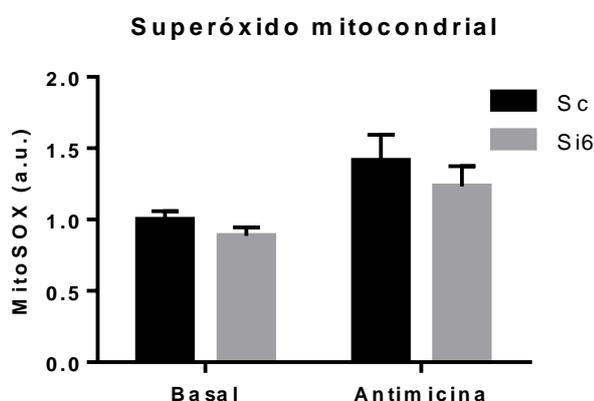


Figura 24. Producción de superóxido en condiciones de estrés oxidativo en células L6E9. Las células fueron incubadas con 50 μM de Antimicina y posteriormente con 2,5 μM de la sonda MitoSOXTM. Las barras muestran la media \pm el error estándar de la media de 4 experimentos independientes por duplicado.

f) Respiración mitocondrial

Tras analizar el efecto del estrés oxidativo en ambos modelos se decidió estudiar otros parámetros de la cadena respiratoria y la síntesis de ATP para entender el efecto de TP53INP2 en la función mitocondrial.

Utilizando la tecnología de Seahorse Bioscience, que nos permite medir la tasa de consumo de oxígeno (OCR), se puede analizar la respiración mitocondrial de las células a través de la inyección seriada de ciertos compuestos.

El ensayo permite medir en primer lugar la **respiración basal** para obtener el estado de reposo de las células. A continuación, la actividad ATPasa se bloquea utilizando Oligomicina, y la caída de la tasa de consumo de oxígeno que se observa, refleja la respiración necesaria para sostener el consumo de oxígeno en las células. La respiración remanente refleja el “**proton leak**” de las mitocondrias, es decir el flujo de protones a través de la membrana mitocondrial interna (MMI), el cual ahora genera calor y no ATP. Conviene mencionar que este parámetro puede ser influenciado por la composición de la MMI (lípidos y proteínas), así como también por el nivel de estrés oxidativo del sistema. Seguidamente, la adición del desacoplante FCCP muestra la **respiración máxima**. FCCP es un compuesto que transporta los protones a través de la MMI y disipa el gradiente electroquímico (potencial de membrana) que conduce a la síntesis de ATP. Para mantener el potencial de membrana, la mitocondria necesita incrementar el flujo de electrones y por lo tanto el consumo de oxígeno. Esta medida refleja cómo un sistema reacciona a una mayor demanda de ATP. Si la respiración máxima está disminuida puede conducir a una crisis energética. Finalmente, la adición de la mezcla Antimicina-Rotenona detiene toda la respiración mitocondrial. Estos compuestos inhiben el complejo III y I respectivamente y son usados para sustraer otras fuentes de consumo de oxígeno no mitocondriales, de esta manera se calcula la respiración de los componentes específicos de la mitocondria.

Es importante señalar que cada uno de los parámetros obtenidos (respiración basal, “proton leak”, respiración asociada a la producción de ATP, respiración máxima y la capacidad respiratoria residual) fue normalizado utilizando la masa mitocondrial.

Los parámetros determinados en el modelo de sobreexpresión de TP53INP2 se muestran en la Figura 25. Cada uno de estos muestra una disminución respecto al control. De ello se puede interpretar que si bien TP53INP2 produce un incremento de la masa mitocondrial, este efecto no se encuentra asociado a un mejor desempeño de la función mitocondrial

en las células. Un probable mecanismo que podría explicar estos efectos sería una alteración a nivel de la remoción o degradación mitocondrial en la célula. Antes de analizar la degradación es conveniente descartar el efecto de TP53INP2 en la biogénesis mitocondrial.

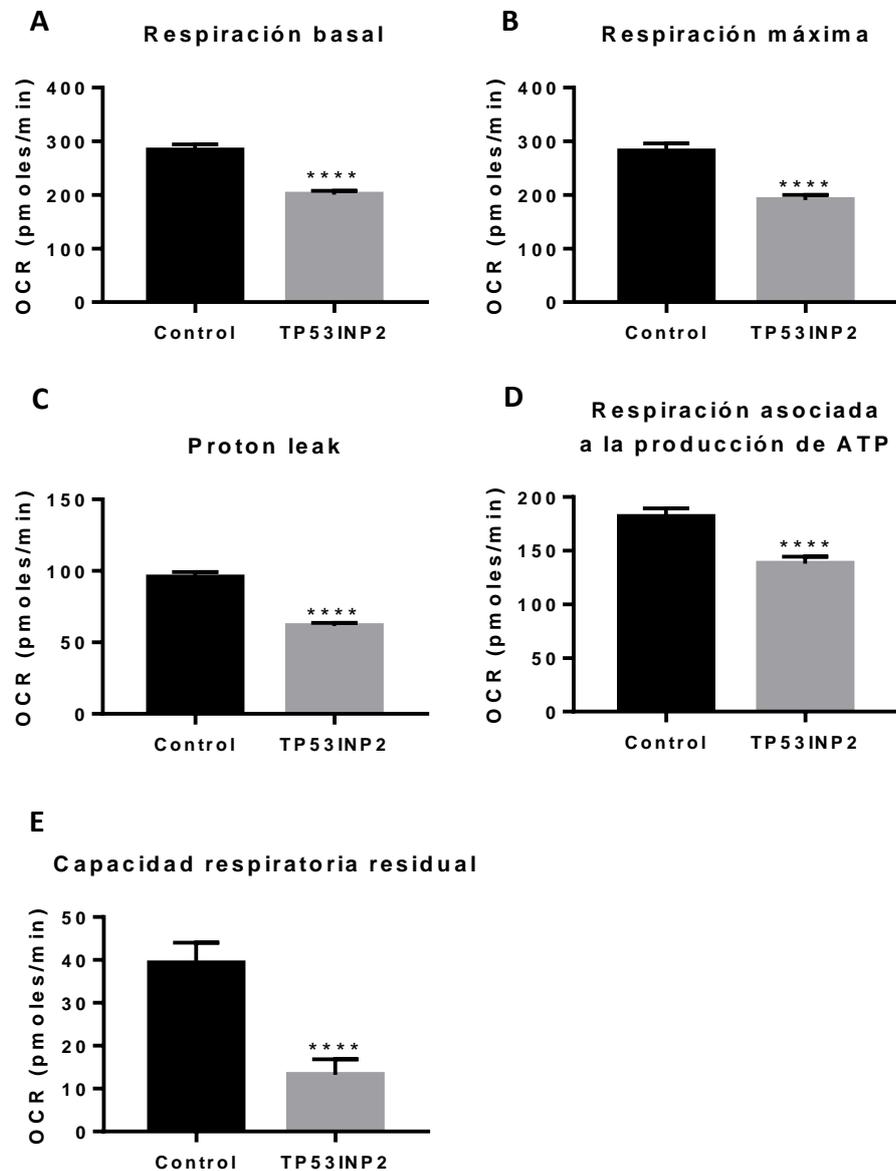


Figura 25. Respiración mitocondrial en el modelo de sobreexpresión de TP53INP2. Se determinó el consumo de oxígeno en células HeLa YFP-Parkin transducidas con los adenovirus que codifican para TP53INP2 y GFP (control). A través de la adición sucesiva de los compuestos Oligomicina, FCCP, Antimicina y Rotenona se determinó los parámetros respiratorios (A) Respiración basal, (B) Respiración máxima, (C) Proton Leak, (D) Respiración asociada a la producción de ATP y (E) Capacidad respiratoria residual. Los gráficos muestran la media y el error estándar de la media del consumo de oxígeno expresado en pmol O₂ / min de 4 experimentos independientes, cada uno con 11 réplicas, normalizados por el promedio de la masa mitocondrial. **** indica diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,00005$ de una prueba t de Student realizada con 2 colas de distribución.

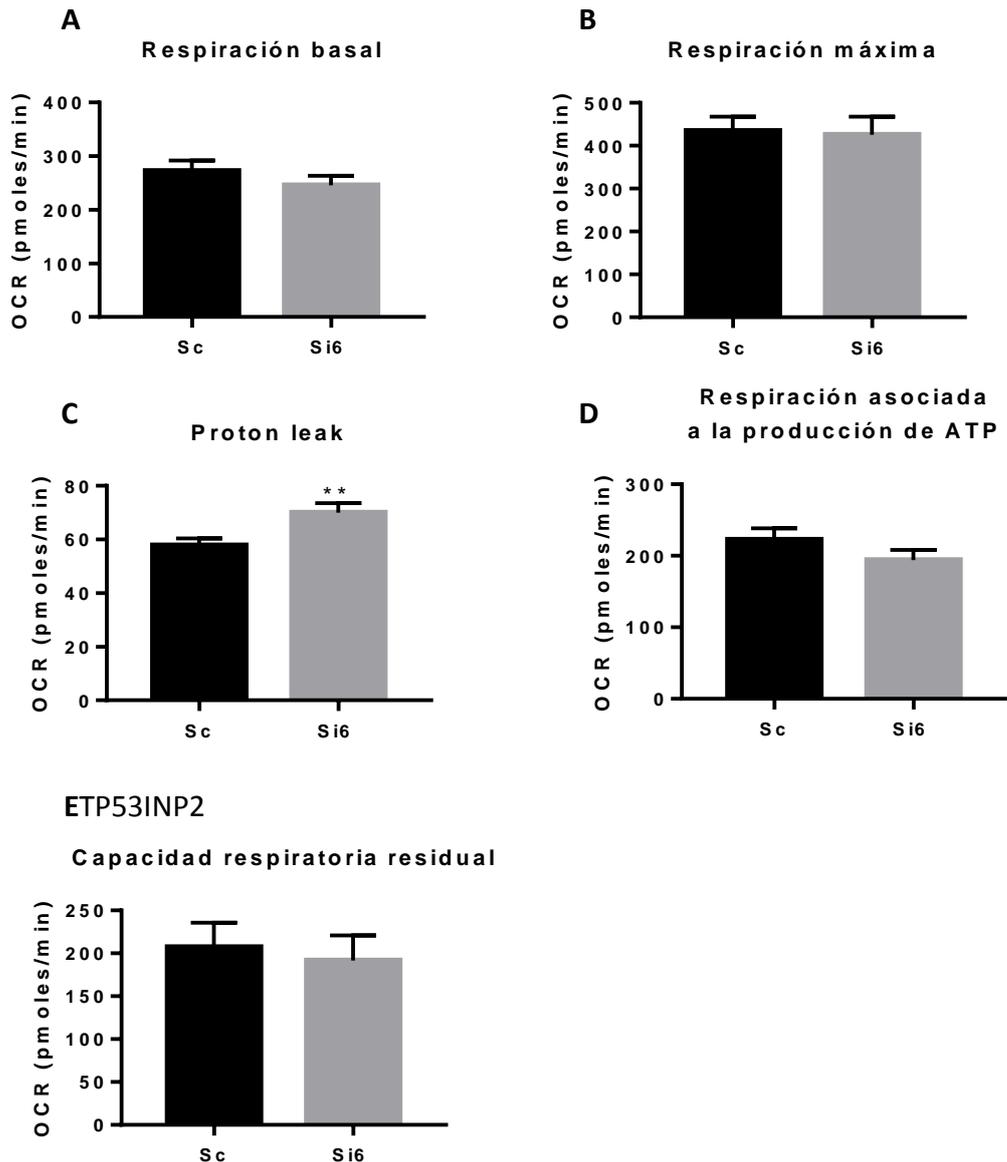


Figura 26. Respiración mitocondrial en el modelo de knockdown de TP53INP2. Se determinó el consumo de oxígeno en células L6E9 scramble (control) y ShRNA TP53INP2. Gracias a la adición sucesiva de los compuestos Oligomicina, FCCP, Antimicina y Rotenona se determinó los parámetros respiratorios (A) Respiración basal, (B) Respiración máxima, (C) Proton Leak, (D) Respiración asociada a la producción de ATP y (E) Capacidad respiratoria residual. Los gráficos muestran la media y el error estándar de la media del consumo de oxígeno expresado en pmol O₂ / min de 3 experimentos independientes, cada uno con 11 réplicas, normalizados por el promedio de la masa mitocondrial. ** indica diferencias estadísticamente significativas con una p<0,005 de una prueba t de Student realizada con 2 colas de distribución.

En el caso de las células “knockdown” de TP53INP2, los parámetros analizados se muestran en la Figura 26. Como se puede apreciar en los paneles sólo se encontró diferencias significativas en el estado de “Proton Leak”. El resto de parámetros de la respiración mitocondrial no se alteró por la pérdida de función de TP53INP2.

Toda esta información parece indicar que la funcionalidad de las mitocondrias en las células L6E9 no se encuentra altamente comprometida como en el caso de las células donde se sobreexpresa TP53INP2.

g) Biogénesis mitocondrial

El siguiente aspecto que decidimos estudiar fue la biogénesis mitocondrial. Como se sabe este evento se encuentra fuertemente regulado por la familia de coactivadores transcripcionales PGC, a través de PGC-1 α y PGC-1 β . Siendo PGC-1 α considerado como el regulador maestro de la biogénesis mitocondrial a través de la coordinación de diferentes factores de transcripción. Asimismo, la expresión de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo se encuentra mediado predominantemente por dos factores de transcripción nuclear, los factores NRF1 y NRF2 (también conocido como GABP α , del inglés *GA-binding protein α*). Ambos factores de transcripción, pero principalmente NRF1, controlan la expresión de genes que codifican la expresión de citocromo c y la mayoría de subunidades codificadas en el núcleo que están involucrados en la cadena de transporte de electrones, así como también proteínas implicadas en la replicación, transcripción y traducción del ADN mitocondrial (Quirós, Mottis, & Auwerx, 2016). El mecanismo de coactivación por parte de PGC-1 α de los factores respiratorios nucleares NRF1 y NRF2 da lugar a la activación del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), involucrado tanto en la transcripción como en la replicación del ADN mitocondrial, esto ocurre a través del promotor proximal de TFAM que contiene sitios de reconocimiento para NRF1 y NRF2 (Lee, Kang, Park, Jeong, & Pak, 2014). La proteína TFAM es codificada en el núcleo, posteriormente el precursor de TFAM que contiene una secuencia de orientación hacia la mitocondria (MTS) es sintetizado en el citosol. Tras el reconocimiento de la secuencia MTS por la maquinaria de transporte de la membrana mitocondrial externa, la molécula precursora es importada a la mitocondria, donde es procesada para generar la proteína madura. Una de las funciones más importantes de esta proteína es la organización del genoma mitocondrial localizado en la matriz mitocondrial, dado que el ADN de las mitocondrias carece de proteínas similares a las histonas se encuentra organizado en unas estructuras compactas conformadas por ADN mitocondrial y proteínas denominadas nucleoides (Ngo, Lovely, Phillips, & Chan, 2014). TFAM es una de las proteínas más abundantes de los nucleoides y se cree que recubre el genoma mitocondrial entero y lo compacta. De esta manera TFAM protege al ADNmit del ataque de especies reactivas de

oxígeno mientras que el ADNmit protege a TFAM de la degradación por la proteasa Lon (Lee et al., 2014).

Por tanto, para analizar si existían diferencias a nivel de la biogénesis de mitocondrias se analizaron los niveles de PGC-1 α , NRF1 y TFAM. Los resultados obtenidos en las células HeLa YFP-Parkin se presentan en la Figura 27.

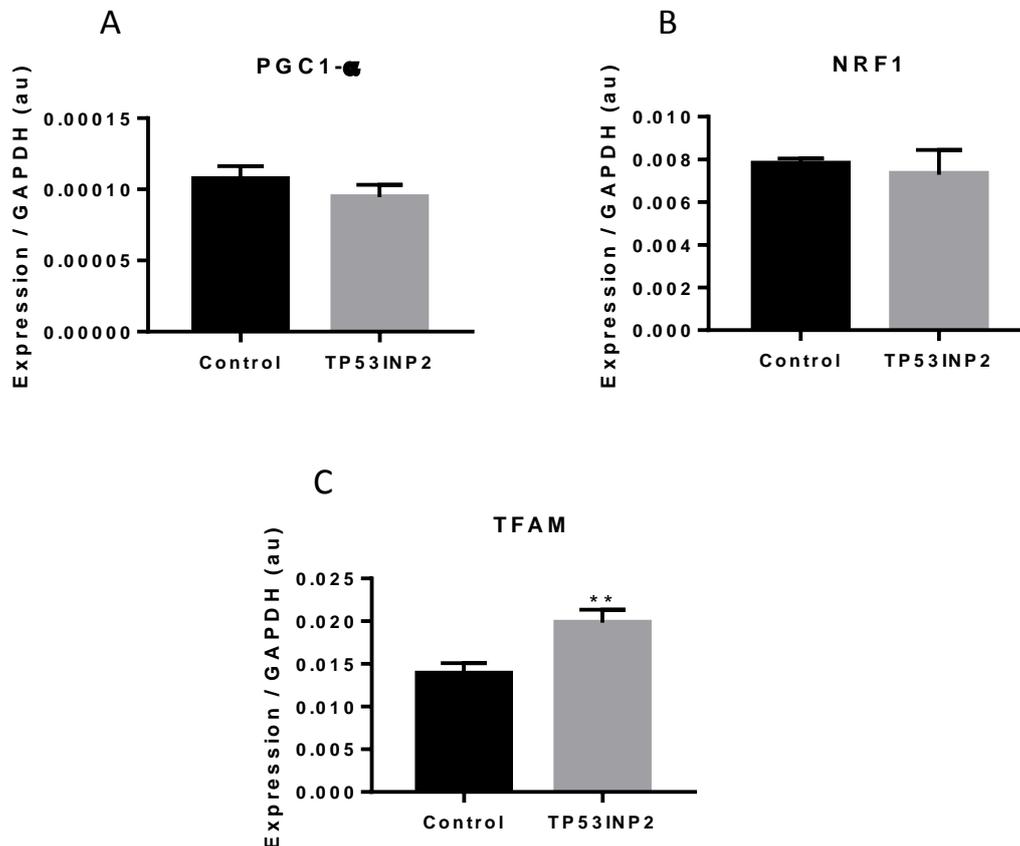


Figura 27. Análisis de RNA mensajero de PGC-1 α , NRF1 y TFAM en células HeLa YFP-Parkin que sobreexpresan TP53INP2. Las células HeLa YFP-Parkin fueron transducidas con 50 virus por célula de los adenovirus que codifican para TP53INP2 (barras grises) y GFP (control, barras negras). El RNA total fue extraído 48 horas después de la transducción. 2 μ g del RNA total fue posteriormente retrotranscrito para obtener cDNA, el cual fue sometido posteriormente a una PCR de tiempo real. Los gráficos muestran la media y el error estándar de la media de los niveles de (A) PGC-1 α , (B) NRF1 y (C) TFAM relativos a GAPDH, provenientes de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * muestra significación estadística con un valor de $p < 0,05$ de una prueba t de Student realizada con 2 colas de distribución.

Los niveles de PGC-1 α no muestran diferencias significativas, así tampoco los niveles de NRF1. Sin embargo TFAM se encuentra ligeramente incrementado en las células que sobreexpresan TP53INP2, esto probablemente se debe a que como se ha visto antes hay un incremento de la masa mitocondrial, que sin embargo, tal como lo demuestran los niveles de PGC-1 α y NRF1, no se encuentra relacionado con un aumento de la biogénesis de mitocondrias.

Respecto a las células con pérdida de función de TP53INP2, en estas no se pudo determinar PGC-1 α . Se utilizaron 2 sets de “primers” pero en cada caso la expresión fue muy pobre. Así que solamente se determinó NRF1 y TFAM, estos resultados se muestran en la Figura 28. En cada uno de estos no se encontró diferencias significativas entre el control y las células “knockdown” de TP53INP2.

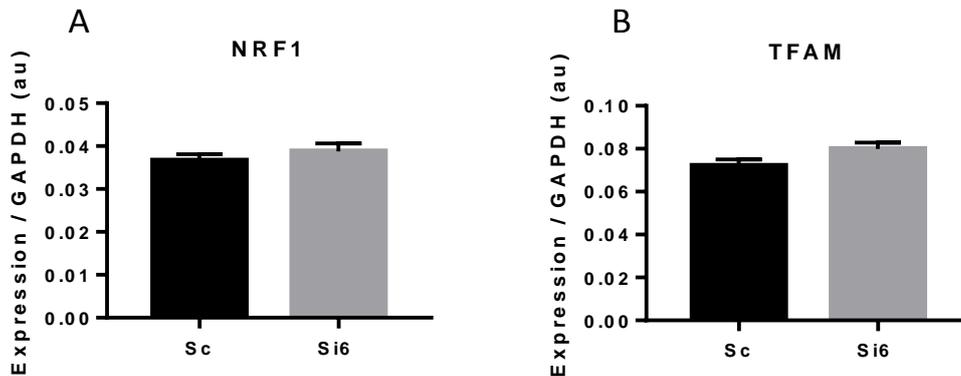


Figura 28. Niveles de NRF1 y TFAM en el modelo L6E9 knockdown de TP53INP2. El RNA extraído de las células control (negro) y knockdown de TP53INP2 (gris) fue utilizado para obtener cDNA. Posteriormente éste fue sometido a real time PCR. Los gráficos muestran la media y el error estándar de la media de 3 experimentos independientes realizados por triplicado de los niveles de (A) NRF1 y (B) TFAM relativos a GAPDH.

En resumen, el estudio de la regulación de la biología mitocondrial por TP53INP2 en el modelo que sobreexpresa esta proteína presentó un incremento de la masa mitocondrial. No obstante, este efecto no se encuentra relacionado con una inducción de la expresión de coactivadores de la biogénesis mitocondrial. Además las mitocondrias de este modelo presentan una disminución del potencial de membrana y una deficiente función respiratoria mitocondrial, así como también son mucho más susceptibles al estrés oxidativo. Todos estos resultados nos señalan una disfunción a nivel de la degradación mitocondrial.

Sin embargo los resultados del modelo celular “knockdown” de TP53INP2 no son tan claros. Es evidente que hay una disminución de la masa mitocondrial y del potencial de membrana pero la respiración mitocondrial no se ve alterada en su totalidad, solo el proton leak y muy sutilmente la producción de ATP. Esto podría deberse a mecanismos compensatorios por parte de estas células ó a que no se trata de un modelo de silenciamiento total de TP53INP2. Por todo esto, en adelante se prosigue el estudio del papel de TP53INP2 en la degradación mitocondrial utilizando el modelo de las células HeLa YFP-Parkin.

4) Estudio de la regulación de la actividad autofágica mitocondrial por TP53INP2

a) Localización de TP53INP2 en condiciones de daño mitocondrial

i) Utilizando células HeLa MitoDsRed

Estudios preliminares de localización de la proteína TP53INP2 en condiciones de estrés mitocondrial fueron realizados por la Dra. Saadet Turkseven. Incubaciones de 12 horas con el agente despolarizante de la membrana interna carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), demostraron que TP53INP2 es reclutado a la mitocondria en células HeLa que expresan de manera estable la proteína fluorescente MitoDsRed (Figura 29). Cabe señalar que estas células fueron transfectadas con TP53INP2.

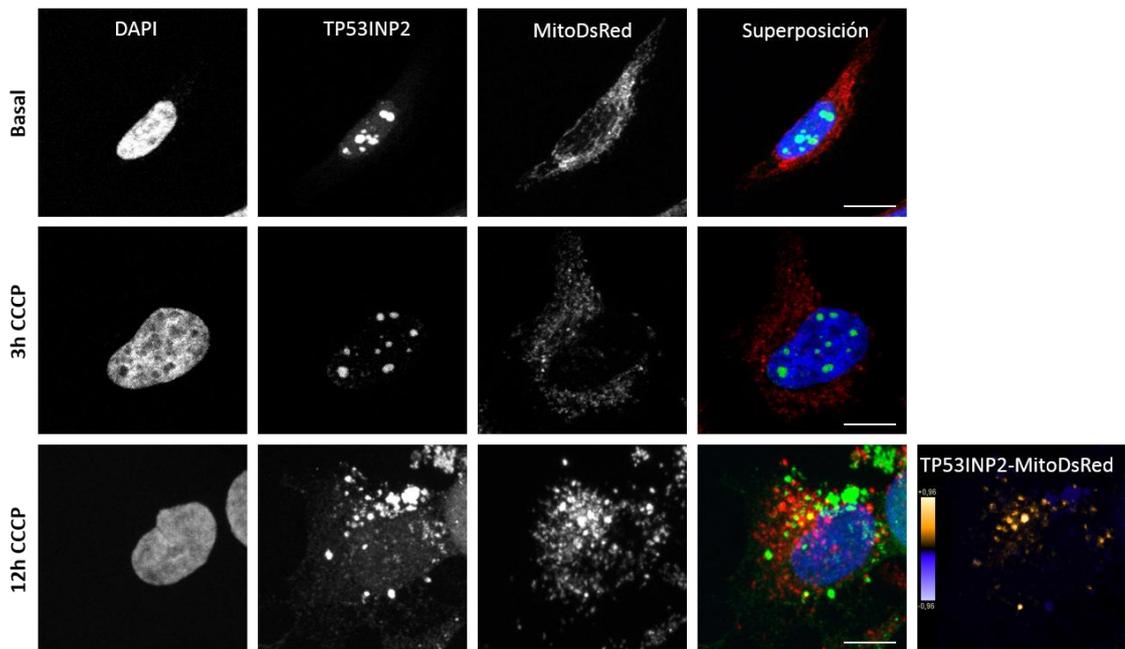


Figura 29. Localización de TP53INP2 en células HeLa MitoDsRed. Células HeLa que expresan de manera estable MitoDsRed fueron transfectadas con TP53INP2 e incubadas con medio conteniendo DMSO y CCCP 30 μ M por 0h, 3h y 12h. La localización intracelular de TP53INP2 fue analizada por inmunofluorescencia. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst y son mostrados en azul, TP53INP2 en verde y MitoDsRed en rojo. En la figura se muestran las imágenes RGB de los diferentes canales. La imagen de colocalización es la proyección Z del producto de las diferencias de las medias (PDM) como se explica en la sección de materiales y métodos. En la imagen PDM, los píxeles que no colocalizan se muestran en azul mientras que los píxeles que co-localizan en amarillo. Escala de barras 10 μ m.

ii) En células transfectadas con GFP-LC3

Posteriormente se analizó si el reclutamiento de TP53INP2 podía ser alterado por la expresión de otras proteínas como GFP-LC3. Tal como se indicó en la primera parte de esta tesis, LC3 es una proteína utilizada como marcador de autofagosomas que interacciona con TP53INP2 a través del motivo peptídico LIR (Mauvezin et al., 2010). En este caso, las células HeLa MitoDsRed fueron transfectadas con TP53INP2 y GFP-LC3 y posteriormente fueron incubadas con CCCP. El reclutamiento de TP53INP2 a las mitocondrias en estas condiciones se redujo considerablemente, a 1 hora de incubación con CCCP ya se podía observar la localización de TP53INP2 en las mitocondrias como se puede apreciar en la Figura 30.

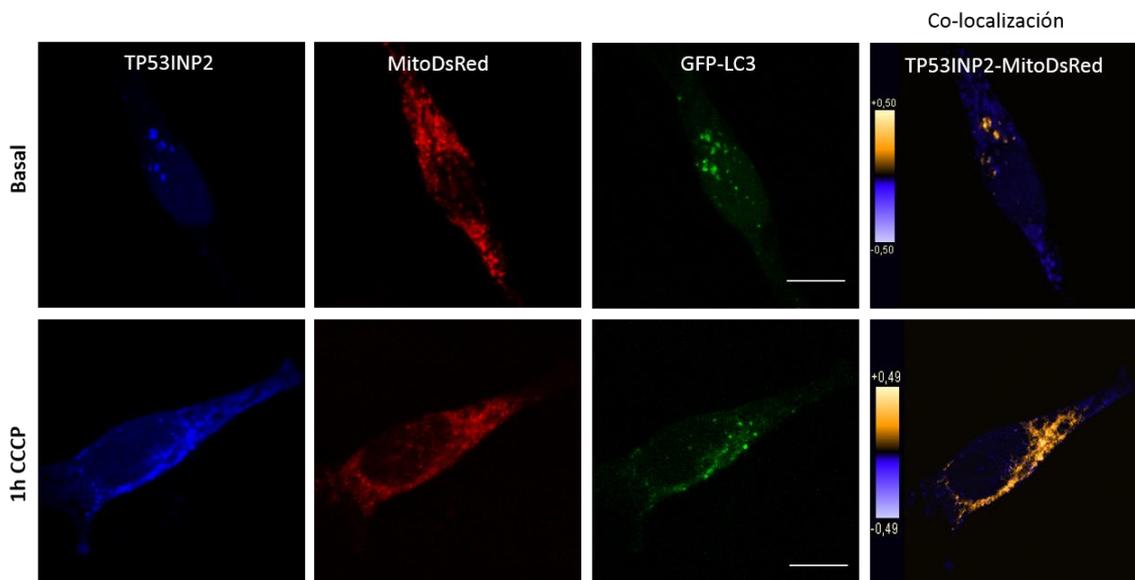


Figura 30. Localización de TP53INP2 en células HeLa MitoDsRed transfectadas con GFP-LC3. Las células HeLa que expresan de manera estable MitoDsRed fueron transfectadas con TP53INP2 y GFP-LC3. Posteriormente fueron incubadas en medio conteniendo DMSO (basal) y CCCP 30 μ M durante 0h, 1h, 3h, 6h y 12h. La localización intracelular de TP53INP2 fue analizada por inmunofluorescencia y es mostrada en azul, MitoDsRed en rojo y GFP-LC3 en verde. En la figura se muestran las imágenes RGB superpuestas y corregidas por contraste a tiempo 0 y 1h de incubación y la proyección Z de la imagen PDM. En la imagen PDM, los píxeles que no colocalizan se muestran en azul mientras que los píxeles que co-localizan se muestran en amarillo. Escala de barras 10 μ m.

iii) En células transfectadas con YFP-Parkin

También se analizó el efecto de la expresión de YFP-Parkin. En esta situación, nuevamente se observó una disminución en el tiempo de reclutamiento de TP53INP2 a la mitocondria. A partir de 1 hora podía observarse en muy pocas células (menos del

8%) el desplazamiento de TP53INP2 fuera del núcleo. Pero a 3 horas se observa un mayor porcentaje de células (más del 50%). En la figura 31 se presentan imágenes representativas de la localización de TP53INP2 en estas condiciones. Asimismo puede observarse que en condiciones basales Parkin se distribuye de manera difusa por toda la célula, sin embargo al cabo de 3 horas de incubación con CCCP, Parkin se agrupa en la mitocondria formando agregados.

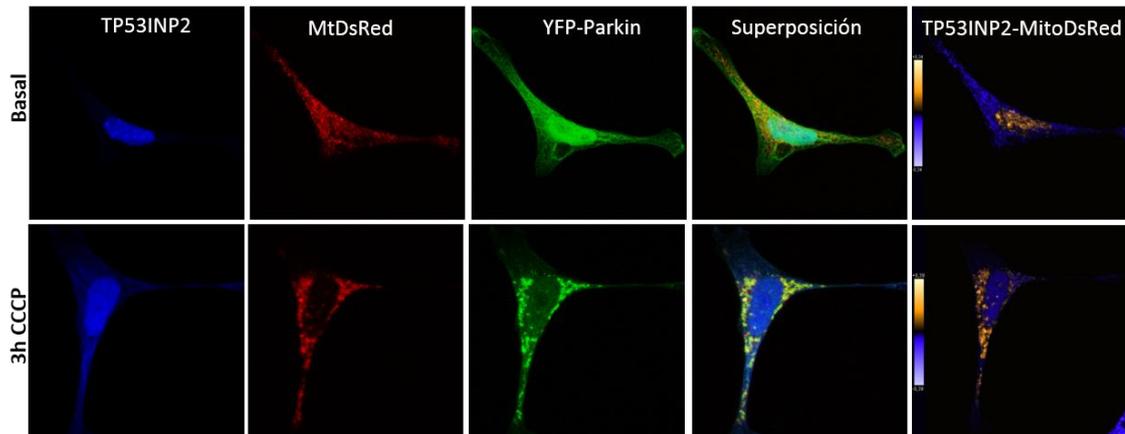


Figura 31. Localización de TP53INP2 en células HeLa MitoDsRed transfectadas con YFP-Parkin. Las células HeLa que expresan de manera estable MitoDsRed fueron transfectadas con TP53INP2 y YFP-Parkin. Posteriormente fueron incubadas en medio conteniendo DMSO y CCCP 30 μ M durante 0h, 1h, 3h, 6h y 12h. La localización intracelular de TP53INP2 fue analizada por inmunofluorescencia y es mostrada en azul, MitoDsRed en rojo y YFP-Parkin en verde. Las imágenes RGB superpuestas y corregidas por contraste (a tiempo 0 y 3h de incubación) y la proyección Z de la imagen PDM son mostradas en los diferentes paneles. En la imagen PDM, los píxeles que no colocalizan se muestran en azul mientras que los píxeles que co-localizan en amarillo. Escala de barras 10 μ m.

iv) Utilizando Valinomicina

Adicionalmente, se estudió la localización de TP53INP2 cuando se utilizaron otros compuestos que afectaban la función mitocondrial como por ejemplo Valinomicina. Este compuesto actúa como un ionóforo, es decir hace la membrana mitocondrial interna permeable a compuestos que normalmente no lo son, de esta manera destruye el gradiente electroquímico.

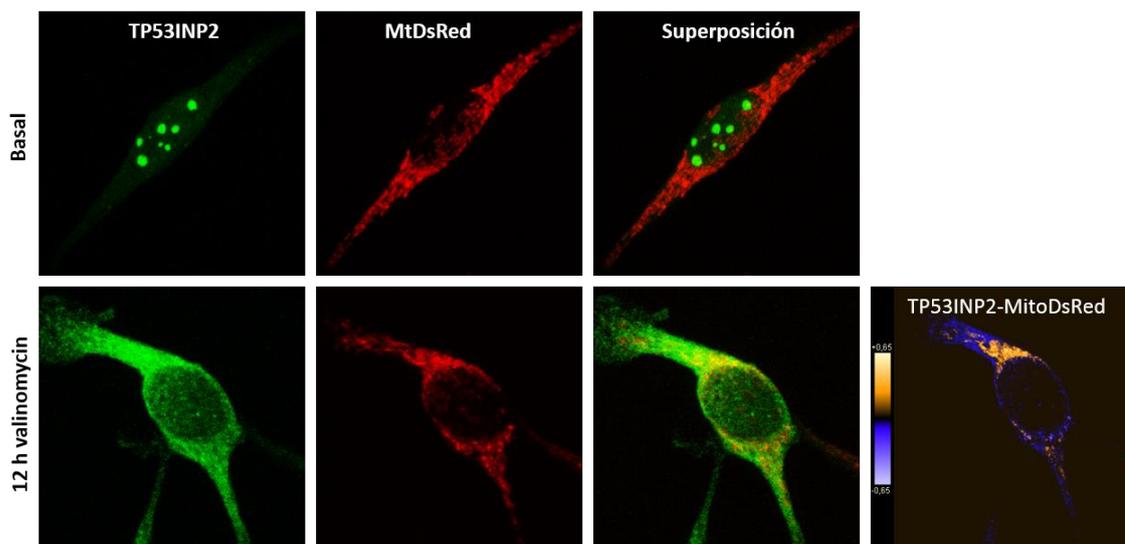


Figura 32. Localización de TP53INP2 en células HeLa MitoDsRed incubadas con Valinomicina. Las células HeLa que expresan de manera estable MitoDsRed fueron transfectadas con TP53INP2. Posteriormente fueron incubadas en medio conteniendo etanol y Valinomicina 1 μ M durante 1h, 3h, 6h y 12h. La localización intracelular de TP53INP2 fue analizada por inmunofluorescencia y es mostrada en verde y MitoDsRed en rojo. Las imágenes RGB superpuestas y corregidas por contraste (a tiempo 0 y 12h de incubación) y la proyección Z de la imagen PDM son mostradas en los diferentes paneles. En la imagen PDM, los píxeles que no co-localizan se muestran en azul mientras que los píxeles que co-localizan en amarillo. Escala de barras 10 μ m.

En condiciones en las cuales solamente se sobreexpresó TP53INP2 se observó la salida de TP53INP2 hacia las mitocondrias al cabo de 12 horas de incubación con Valinomicina (Figura 32).

v) Utilizando Deferoxamina

El otro compuesto utilizado fue Deferoxamina, ampliamente conocido como quelante o secuestrador de hierro. Hace algunos años este compuesto fue descrito como un inductor de autofagia mitocondrial (Allen et al., 2013) aunque el mecanismo exacto no ha sido determinado. La incubación de células que expresan Parkin mostró que TP53INP2 es reclutado hacia la mitocondria, sin embargo este desplazamiento es independiente de la activación de Parkin. Probablemente debido a que el mecanismo de este compuesto no implica despolarización de la membrana Parkin no forma agregados (Figura 33).

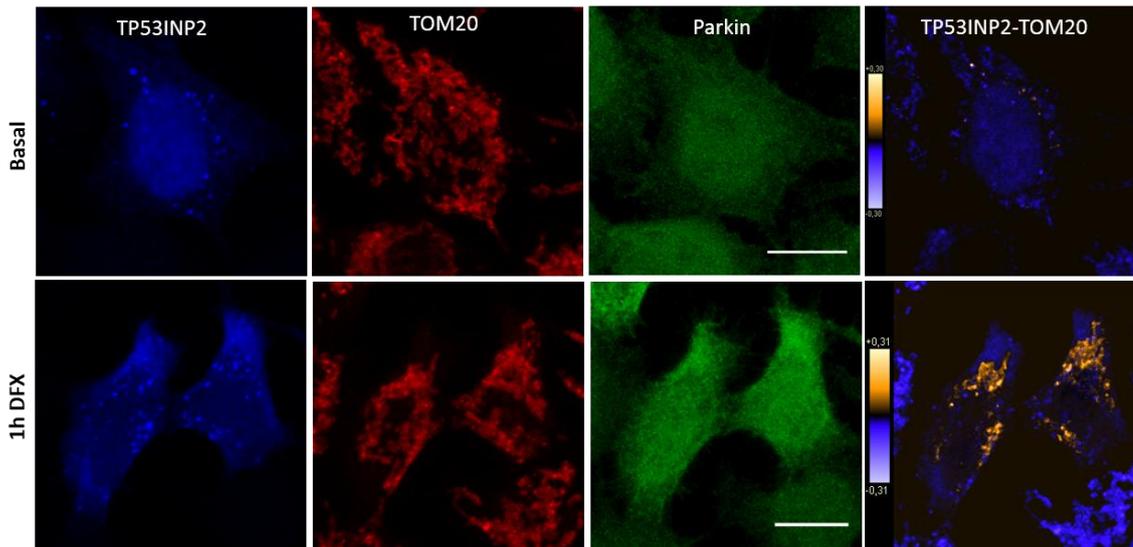


Figura 33. Localización de TP53INP2 en células HeLa MitoDsRed incubadas con Deferoxamina. Las células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transfectadas con TP53INP2. Posteriormente fueron incubadas en medio conteniendo H₂O y Deferoxamina 1 mM durante 1h, 3h, 6h y 12h. La localización intracelular de TP53INP2 fue analizada por inmunofluorescencia y es mostrada en azul, TOM20 en rojo y YFP-Parkin en verde. En la figura se muestran las imágenes RGB superpuestas y corregidas por contraste a tiempo 0 y 1h de incubación y la proyección Z de la imagen PDM. En la imagen PDM, los píxeles que no colocalizan se muestran en azul mientras que los píxeles que colocalizan en amarillo. Escala de barras 10 μ m.

5) Efecto de TP53INP2 en la vía PINK1/Parkin

a) TP53INP2 reduce la degradación de las mitocondrias en la vía PINK1/Parkin

Con el propósito de estudiar el efecto de TP53INP2 en la eliminación de mitocondrias a través de la vía PINK1/Parkin se utilizó la técnica utilizada por Lazarou et al., 2015. Esta técnica describe el uso de anticuerpos anti ADN para visualizar los nucleoides de ADN mitocondrial. Los nucleoides, además de ADN mit, están compuestos por un conjunto de proteínas de unión al ADN implicadas en el mantenimiento y la transcripción del ADNmit y también por una gama de factores periféricos, que son componentes de las vías de señalización que controlan la biogénesis mitocondrial, el metabolismo, la apoptosis y la señalización retrógrada de la mitocondria al núcleo (Gilkerson et al., 2013). A través de la microscopia, los nucleoides son claramente visibles como una serie de puntos discretos distribuidos a través de la red mitocondrial.

Siguiendo el protocolo de Lazarou et al., 2015, se utilizaron células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin transducidas con adenovirus que expresan GFP o TP53INP2. A continuación en la Figura 34 se presentan las imágenes representativas del experimento.

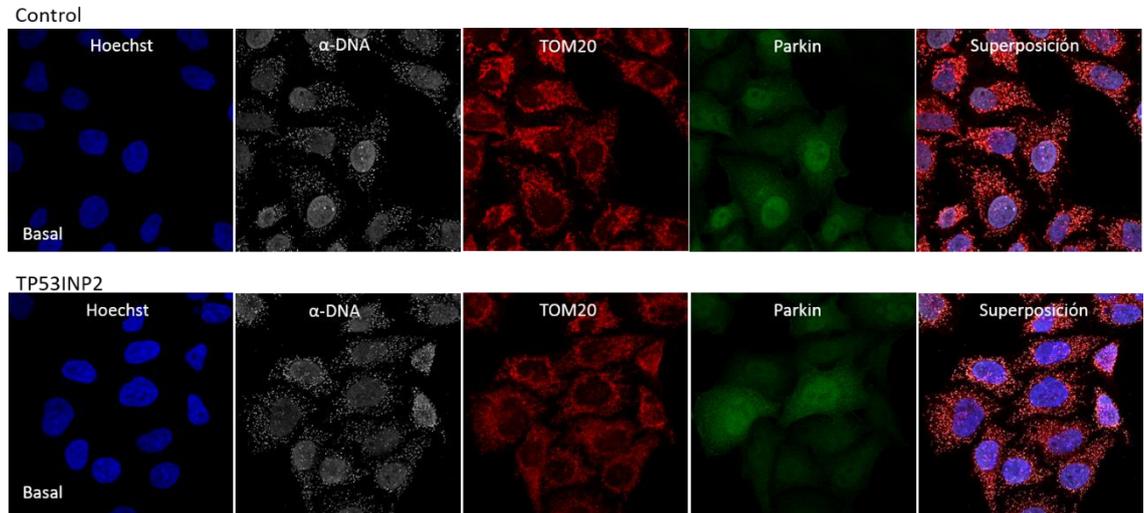


Figura 34. Análisis de la sobreexpresión de TP53INP2 en los nucleoides de DNA mitocondrial. Células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transducidas con 50 MOI por células de adenovirus que codifican para GFP (control) y TP53INP2. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con anticuerpos TOM20 (rojo) y DNA (blanco), los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). En la figura, se muestran las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

Se puede apreciar en la figura anterior que las células que sobreexpresan TP53INP2 muestran un número mayor de nucleoides mitocondriales con respecto al control. Para una mejor visualización se muestra una imagen aumentada de la tinción correspondiente a los nucleoides de DNA (Figura 35).

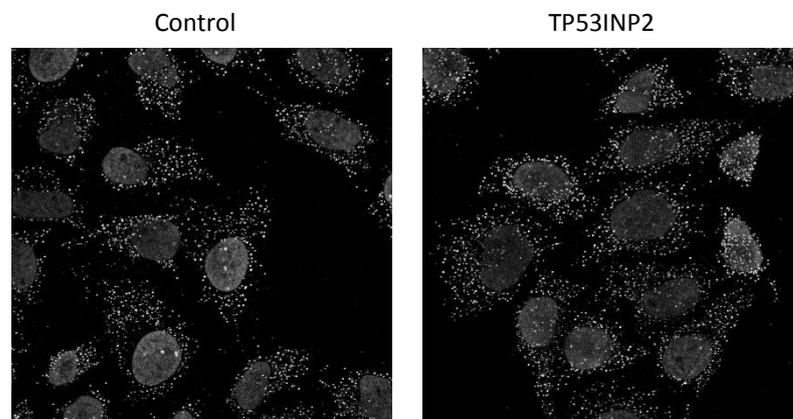


Figura 35. Imágenes amplificada para observar los nucleoides de DNA mitocondrial en células control y células que sobreexpresan TP53INP2

Asimismo, la incubación de las células utilizadas con el agente despolarizante de la membrana mitocondrial mostró una reducción de la agregación en las células que sobreexpresan TP53INP2, como se puede apreciar en la Figura 36.

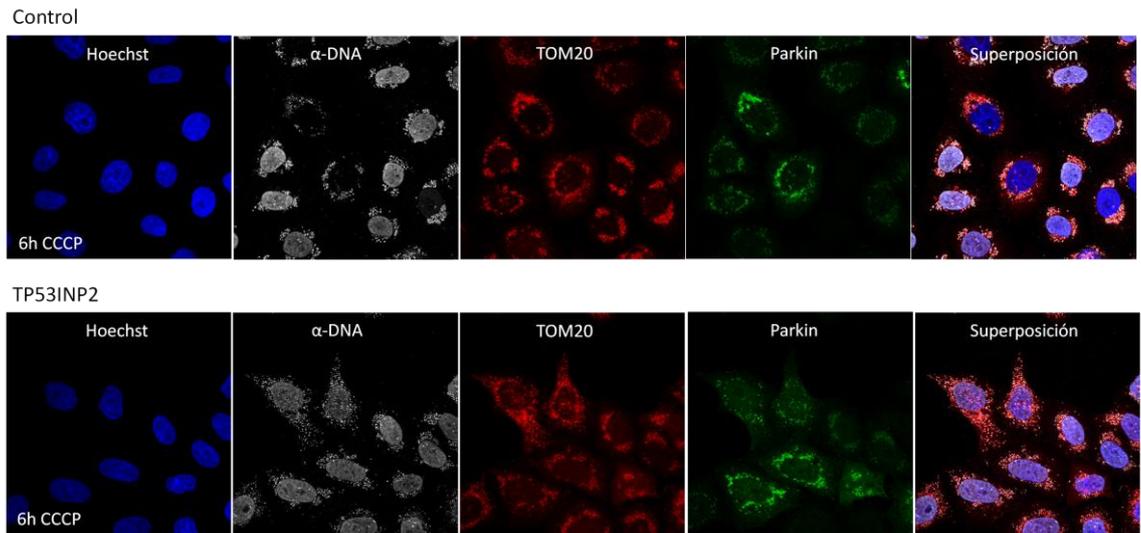


Figura 36. TP53INP2 reduce la clusterización de los nucleoides de DNA mitocondrial. Células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transducidas con 50 MOI por células de adenovirus que codifican para GFP (control) y TP53INP2. 48 horas después fueron incubadas durante 6h en medio con CCCP a una concentración final de 30 μ M. Se presentan las imágenes representativas de las células inmunoteñidas con anti TOM20 (rojo), anti DNA (blanco) y los núcleos teñidos con Hoechst (azul).

La amplificación de las imágenes superpuestas, de la tinción del núcleo y la inmunotinción, del control y de las células que sobreexpresan TP53INP2 son mostradas en la Figura 37.

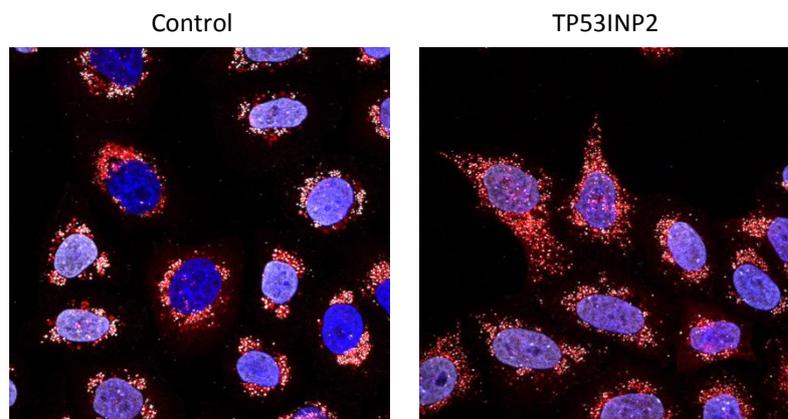


Figura 37. Imágenes amplificadas para observar la clusterización de los nucleoides de DNA mitocondrial por efecto de CCCP en células control y células que sobreexpresan TP53INP2

Una vez que se determinó cualitativamente que TP53INP2 reducía la degradación mitocondrial, se realizó el análisis cuantitativo de los nucleoides, para ello se utilizó el software libre FIJI. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 38.

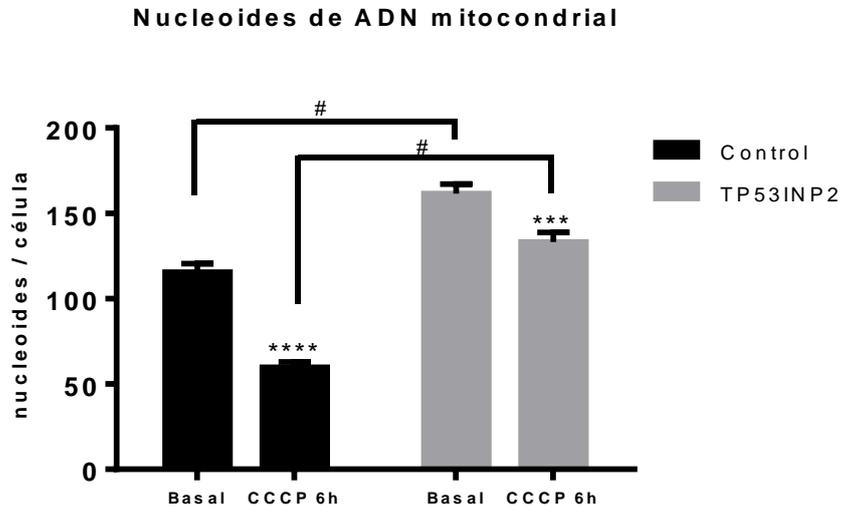


Figura 38. TP53INP2 reduce la degradación mitocondrial en la mitofagia dependiente de Parkin. Células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transducidas con 50 MOI por células de adenovirus que codifican para GFP (control, negro) y TP53INP2 (gris). 48 horas después fueron incubadas durante 0 y 6h en medio sin o con CCCP a una concentración final de 30 μ M. La cuantificación se realizó con el software libre FIJI. Las imágenes de la tinción del núcleo fueron utilizadas para sustraer la tinción correspondiente al DNA del núcleo. Posteriormente se determinó el número de partículas utilizando el comando del menú *Analyze* y la opción *Analyze particles*. Los valores representados en la figura fueron adquiridos a partir de 100-150 células de 2 experimentos independientes. Las barras muestran el promedio y la desviación estándar del promedio. *** y **** indican diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,0005$ y una $p < 0,00005$ de una prueba t de Student realizada con 2 colas de distribución. # indica diferencias estadísticamente significativas de un test de ANOVA de un solo factor, $p < 0,0001$.

Se puede observar que las células control que expresan Parkin de manera estable presentaron una reducción del 50% de nucleoides mitocondriales en respuesta a la incubación con CCCP, por lo tanto inducción de la degradación de mitocondrias. La sobreexpresión de TP53INP2 causó un 30% de incremento de los nucleoides de DNA mitocondriales en condiciones basales y después de 6h de tratamiento con CCCP una disminución del 12% de los nucleoides.

b) TP53INP2 inhibe la acumulación de PINK1 en células HeLa YFP-Parkin

Con el propósito de analizar el mecanismo por el cual TP53INP2 reduce la degradación mitocondrial decidimos estudiar los niveles de la proteína PINK1, involucrada en la activación y reclutamiento de Parkin a la mitocondria (Figura 39).

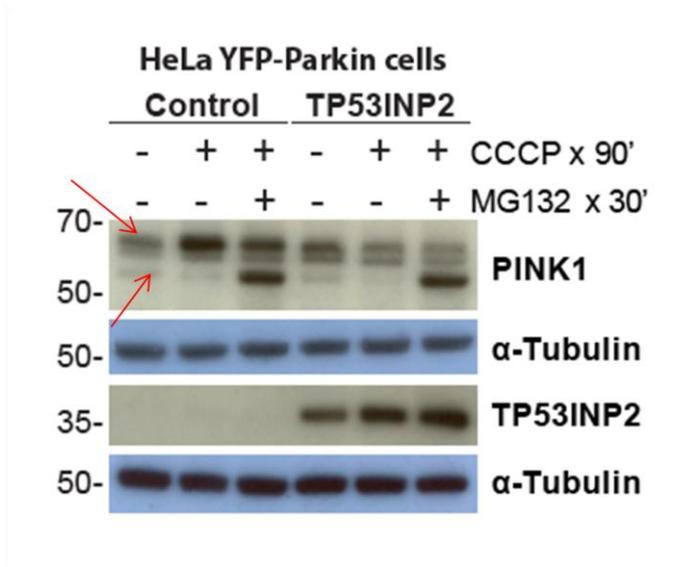


Figura 39. TP53INP2 reduce la acumulación de la forma larga de PINK1. Las células HeLa YFP-Parkin fueron transducidas con una MOI de 50 adenovirus por célula codificantes para GFP (control) y TP53INP2. 48h después fueron incubadas con: a) medio solo, b) CCCP 30 μ M por 90 min, c) MG132 30 μ M por 30 min y CCCP 30 μ M por 90 min. Los anticuerpos comerciales disponibles para PINK1 no son específicos, el anticuerpo utilizado en este experimento fue previamente validado con un modelo knockdown de PINK1. La flecha roja superior indica la forma “full length” de PINK1, la flecha roja inferior indica la forma citosólica de PINK1 que fue previamente recortada en la mitocondria y posteriormente liberada al citosol (forma *cleaved*) para ser degradada por el proteasoma.

Se puede observar que TP53INP2 reduce la acumulación de la forma “full length” de PINK1. Tal como se explicó en la parte de introducción de esta tesis, PINK1 es una proteína importada a la mitocondria, donde es procesada por dos enzimas, luego es liberada al citosol donde es degradada rápidamente por el proteasoma. Todo esto en condiciones donde no existe despolarización de la membrana mitocondrial, por ello es difícil detectar PINK1 en condiciones normales. Sin embargo, cuando la membrana mitocondrial se encuentra despolarizada, PINK1 no se importa a la mitocondria y se acumula en la membrana externa mitocondrial. Por este motivo cuando las células son incubadas con CCCP se observa un incremento de la forma “full length”. En el caso de la incubación con MG132 y posteriormente CCCP se observan 2 bandas (en el menos expuesto), la superior correspondiente a la forma “full length” y la segunda correspondiente a la citosólica, puesto que el compuesto MG132 inhibe al proteasoma no se produce la degradación de la forma recortada de PINK1 que es liberada al citosol para que sea degradada por el proteasoma.

En la Figura 40 se presenta la cuantificación de los niveles de la proteína PINK1.

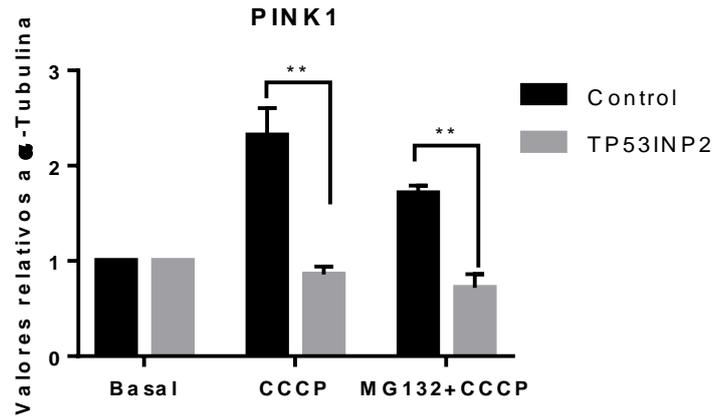


Figura 40. Cuantificación de la forma *full length* de PINK1. Las células HeLa YFP-Parkin fueron transducidas con una MOI de 50 adenovirus por célula codificantes para GFP (control, negro) y TP53INP2 (gris). 48h después fueron incubadas con: a) medio solo, b) CCCP 30 μ M por 90 min, c) MG132 30 μ M por 30 min y CCCP 30 μ M por 90 min. La cuantificación por densitometría se realizó utilizando el programa FIJI, las dos bandas observadas en la exposición larga de la Fig. 42 fueron utilizadas en la cuantificación dado que no era posible seleccionar únicamente la banda superior. Las barras muestran el promedio y la desviación estándar del promedio de 3 experimentos realizados de manera independiente. Los resultados se encuentran referidos respecto a los valores basales. ** indica diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,005$ de una prueba t de Student realizada con 2 colas de distribución.

c) TP53INP2 no inhibe la acumulación de PINK1 en células HeLa

Nos preguntamos si la acumulación de PINK1 también ocurriría en células que no expresan Parkin. Por ello decidimos estudiar el efecto de TP53INP2 sobre la acumulación de PINK1 en células HeLa. Las células HeLa no expresan Parkin debido a la localización del gen Parkin dentro de FRA6E (6q26), un sitio comúnmente frágil del genoma humano que es mutado frecuentemente en tumores ováricos (Kathrin Lutz et al., 2009). Los niveles encontrados de PINK1 se muestran en la Figura 41.

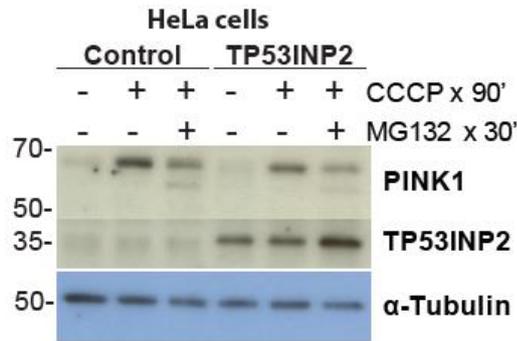


Figura 41. TP53INP2 no reduce la acumulación de la forma larga de PINK1 en células HeLa. Las células HeLa fueron transducidas con una MOI de 50 adenovirus por célula codificantes para GFP (control) y TP53INP2. 48h después fueron incubadas con: a) medio solo, b) CCCP 30 μ M por 90 min, c) MG132 30 μ M por 30 min y CCCP 30 μ M por 90 min.

La figura muestra una ligera disminución de TP53INP2, sin embargo la cuantificación por densitometría (Figura 42) indica que no existen diferencias significativas en los niveles de la forma full length de PINK1 después de la incubación con el agente desacoplante.

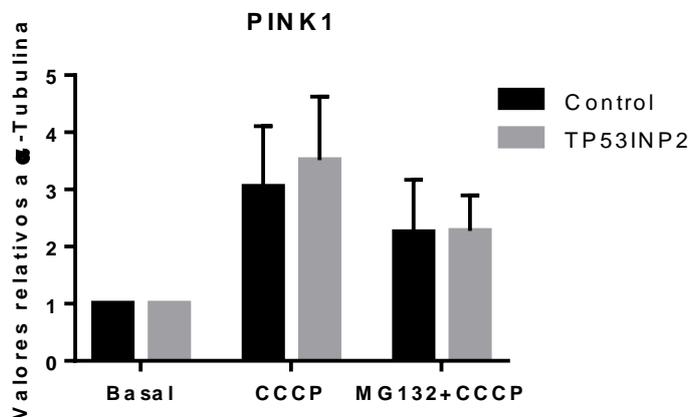


Figura 42. Cuantificación de la forma “full length” de PINK1 en células HeLa. Las células HeLa fueron transducidas con una MOI de 50 adenovirus por célula codificantes para GFP (control, negro) y TP53INP2 (gris). 48h después fueron incubadas con: a) medio solo, b) CCCP 30 μ M por 90 min, c) MG132 30 μ M por 30 min y CCCP 30 μ M por 90 min. Para la cuantificación por densitometría se utilizó el software libre FIJI. Las barras muestran el promedio y la desviación estándar del promedio de 3 experimentos realizados de manera independiente. Los resultados se encuentran referidos respecto a los valores basales.

d) **TP53INP2 inhibe la formación de Ubiquitina fosforilada en S65**

Debido a los bajos niveles de acumulación de PINK1 encontrados en las células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin y sobreexpresan TP53INP2 se decidió estudiar si esto tenía un efecto en la formación de la ubiquitina fosforilada S65.

Como se sabe, una vez que PINK1 se acumula en la membrana mitocondrial por efecto de la despolarización de la membrana interna mitocondrial, esta proteína se dimeriza y fosforila a la ubiquitina adyacente a la membrana externa de las mitocondrias, en el residuo aminoácido serina 65. Seguidamente, la ubiquitina fosforilada recluta a Parkin hacia la mitocondria y una vez aquí, Parkin se une a la ubiquitina fosforilada. Esta interacción induce cambios conformacionales en la estructura de Parkin que permiten la fosforilación de su dominio UBL por PINK1 y la activación de su actividad E3 ligasa.

Efectivamente, la escasa acumulación de PINK1 por efecto de TP53INP2 induce una reducción en la formación de ubiquitina fosforilada en S65, esto se puede apreciar en la Figura 43.

e) TP53INP2 inhibe la degradación de Mitofusina 2

Una vez activado, Parkin ubiquitina algunas proteínas localizadas en la membrana mitocondrial externa, para ser degradadas posteriormente por el proteasoma. Una de estas proteínas es la Mitofusina 2.

Con el propósito de evaluar si la reducción de la ubiquitina fosforilada S65 tiene algún efecto en la degradación de alguna proteína de membrana externa se determinaron los niveles de Mitofusina 2 (Figura 43).

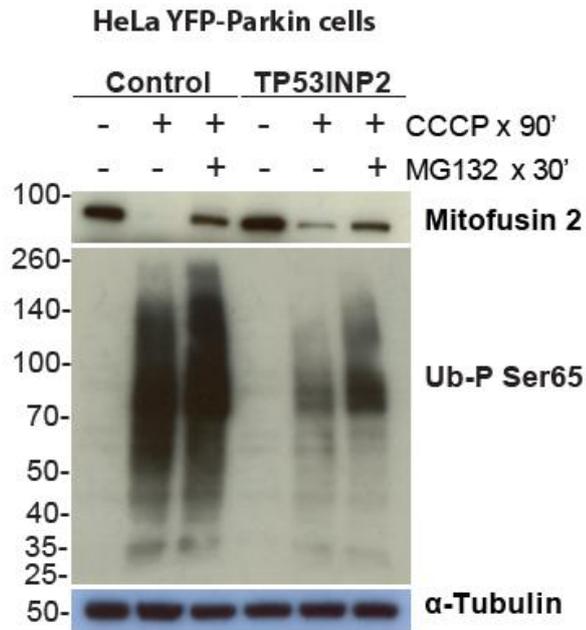


Figura 43. TP53INP2 reduce la fosforilación de ubiquitina por PINK1 y la degradación de Mitofusina 2. Las células HeLa YFP-Parkin fueron transducidas con una MOI de 50 adenovirus por célula codificantes para GFP (control) y TP53INP2. 48h después fueron incubadas con: a) medio solo, b) CCCP 30 μ M por 90 min, c) MG132 30 μ M por 30 min y CCCP 30 μ M por 90 min.

Tal como se aprecia en la figura anterior, la despolarización de la membrana mitocondrial por CCCP, induce la degradación total de Mitofusina 2 en el control, no así en el caso de la sobreexpresión de TP53INP2 donde todavía se observa bajos niveles de Mitofusina 2. Sin embargo, después de la incubación de MG132 y CCCP todavía se observan niveles de Mitofusina 2. Esto se debe a que como se mencionó antes, MG132 inhibe el proteasoma.

f) TP53INP2 interactúa con Parkin

Dado que TP53INP2 inhibe la acumulación de PINK1, de manera dependiente de Parkin decidimos estudiar a través de inmunofluorescencia la localización y distribución de ambas proteínas.

En condiciones basales TP53INP2 se encuentra principalmente en el núcleo y Parkin se encuentra distribuido a través de toda la célula, como se puede apreciar en la Figura 44. El color amarillo de la imagen correspondiente al análisis de colocalización indica que ambas proteínas colocalizan en el núcleo en condiciones basales. Igualmente, tras la incubación de las células por 3h con CCCP, TP53INP2 y Parkin colocalizan, esta vez en las mitocondrias.

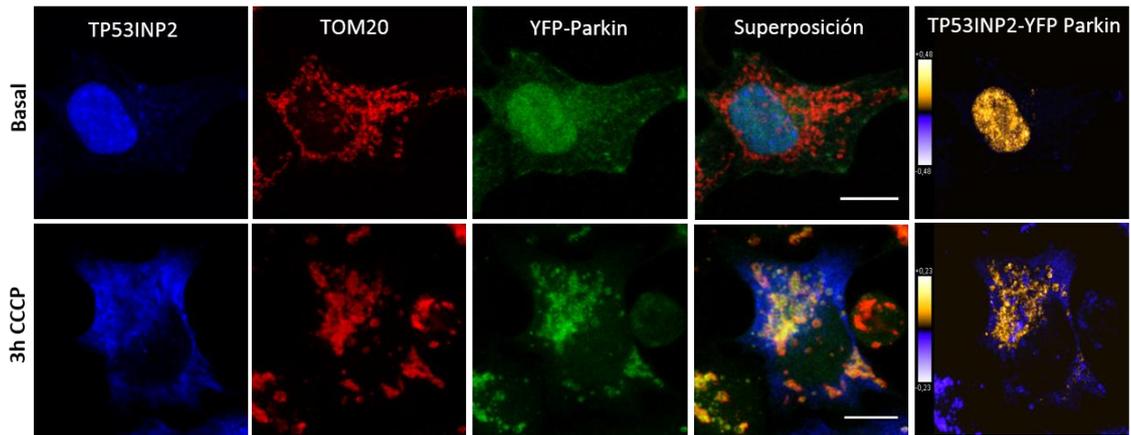


Figura 44. TP53INP2 interacciona con Parkin. Las células HeLa YFP-Parkin fueron transfectadas con TP53INP2. 24h después fueron incubadas con medio solo o con CCCP 30 μ M por 3h. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con anticuerpos TP53INP2 (azul) y TOM20 (rojo). Se muestran las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

Tras observar que TP53INP2 y Parkin colocalizan decidimos estudiar la interacción con una forma mutante de TP53INP2. Así como se indicó en el capítulo 1 de esta tesis, TP53INP2 tiene una secuencia de exportación nuclear (NES), entre los aminoácidos 36 y 40. Esta secuencia, como lo indica su nombre, es responsable de la salida de TP53INP2 del núcleo por lo tanto mutaciones en los aminoácidos comprendidos en esta secuencia retienen a nuestra proteína de estudio en el núcleo.

Utilizando la microscopia de fluorescencia analizamos la distribución e interacción de ambas proteínas, mutante NES de TP53INP2 y Parkin, en células que expresan de manera estable YFP-Parkin (Figura 45). Tanto en condiciones basales como tras la incubación con CCCP, la forma mutante de TP53INP2 se encuentra en el núcleo y no interacciona con Parkin.

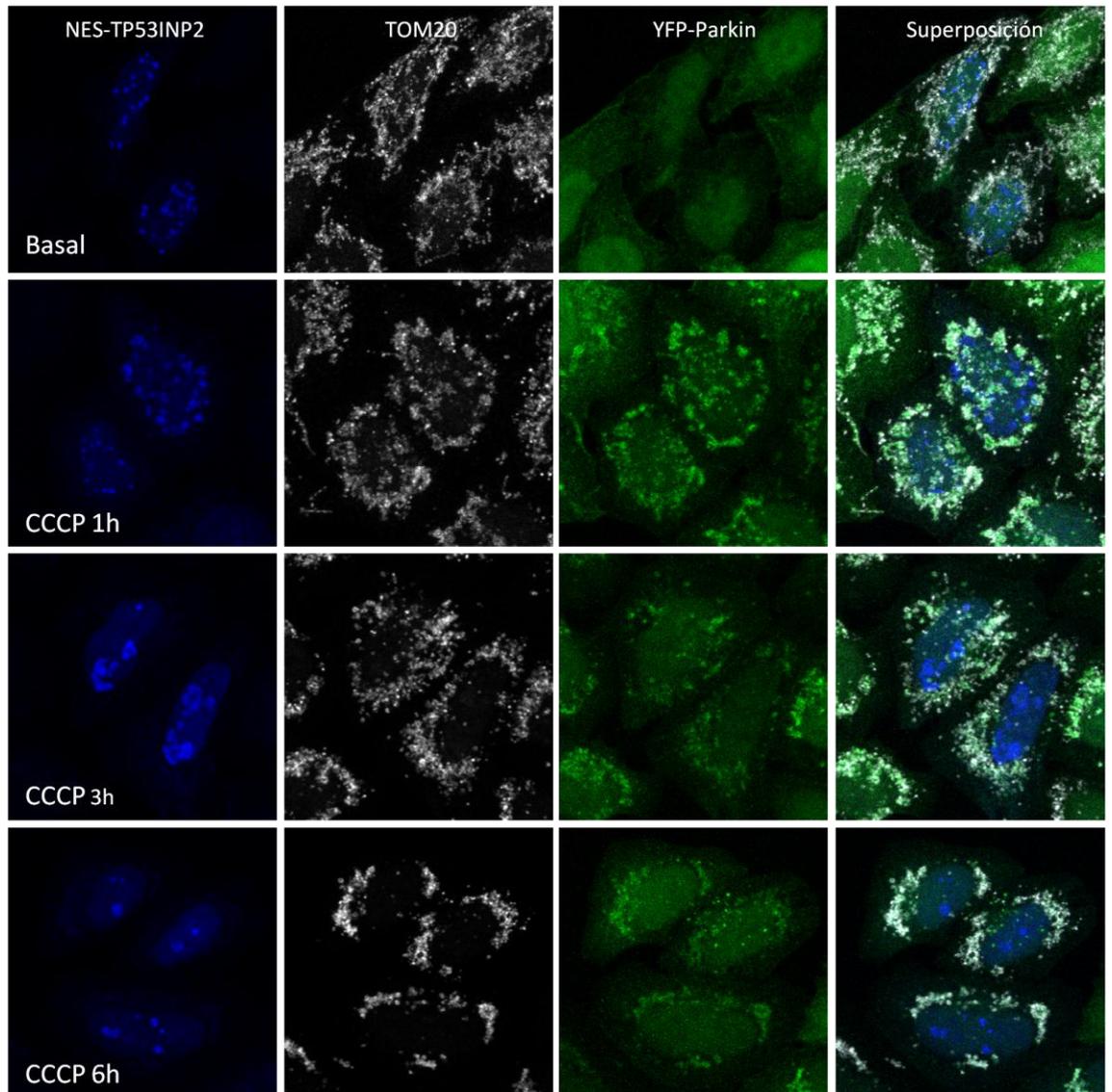


Figura 45. Mutaciones en la secuencia NES de TP53INP2 impiden la interacción con Parkin. Las células HeLa YFP-Parkin fueron transfectadas con la forma mutante NES de TP53INP2. 24h después fueron incubadas con medio solo o con CCCP 30 μ M por 0, 1, 3 y 6h. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con anticuerpos TP53INP2 (azul) y TOM20 (rojo). En la figura, se muestran las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

Seguidamente, nos preguntamos si la interacción de Parkin y TP53INP2 podría ser dependiente de PINK1 por ello investigamos la localización de ambas proteínas en un modelo “knockdown” de PINK1 que habíamos generado en el laboratorio previamente en células HeLa MitoDsRed (Figura 46).

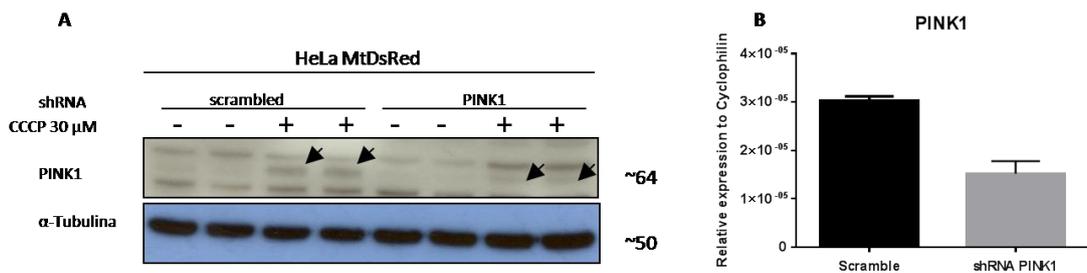


Figura 46. TP53INP2 interacciona con Parkin. Células HeLa que expresan de manera estable MitoDsRed fueron transducidas con lentivirus codificantes para shRNA *scrambled* o shRNA que reconoce el mRNA de PINK1 (como se describe en Materiales y métodos). Las poblaciones obtenidas resistentes a Puomicina fueron utilizadas para determinar la expresión de PINK1 por western blot (A) y los niveles de RNA mensajero (B).

En la Figura 47 se observa la distribución de TP53INP2 y Parkin en las células control y “knockdown” de PINK1. Como se aprecia de las imágenes de colocalización, ambas proteínas continúan interaccionando, aunque, la agregación de Parkin cambia o aparentemente se retrasa comparado a las células control. Exactamente como se describió PINK1 es importante para activar el reclutamiento de Parkin por lo tanto una disminución en la expresión de esta proteína efectivamente afecta la activación / agregación de Parkin en la mitocondria. Además, curiosamente este retardo en la activación de Parkin permite que esta proteína continúe interaccionando con TP53INP2, como se puede observar tras 3 horas de incubación con CCCP en las células “knockdown” y no así en las células control.

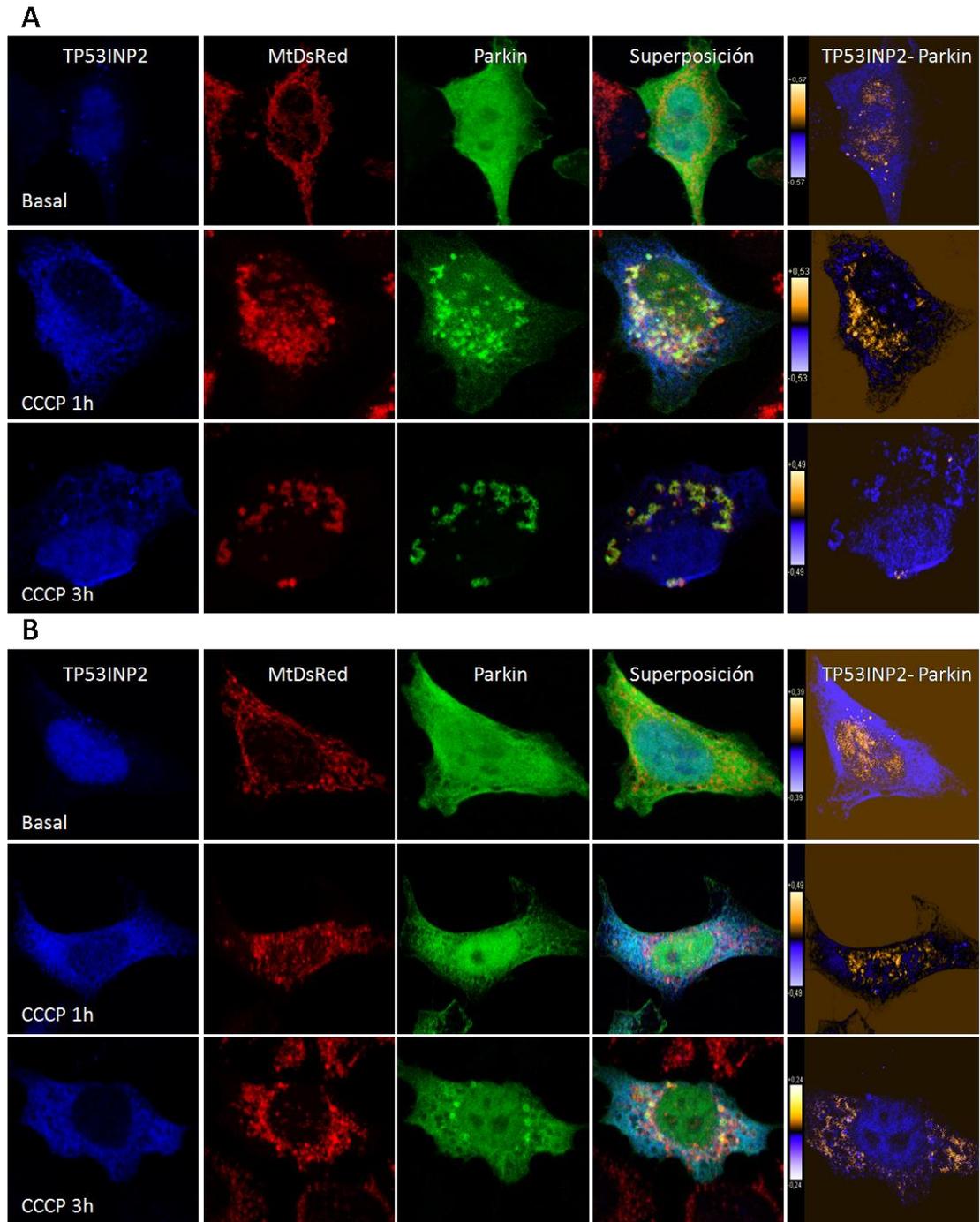


Figura 47. La interacción de TP53INP2 y Parkin es independiente de PINK1. Las células HeLa MitoDsRed shRNA scramble (A) y shRNA PINK1 (B) fueron transfectadas con TP53INP2. 24h después fueron incubadas con medio solo o con CCCP 30 μ M por 0, 1 y 3h. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con anticuerpos TP53INP2 (azul). Se muestran las imágenes representativas superpuestas en RGB y corregidas por contraste.

Después de observar la colocalización de TP53INP2 y Parkin, en condiciones basales o en condiciones de despolarización de la membrana mitocondrial decidimos

estudiar la interacción física de ambas proteínas a través de ensayos de inmunoprecipitación (Figura 48).

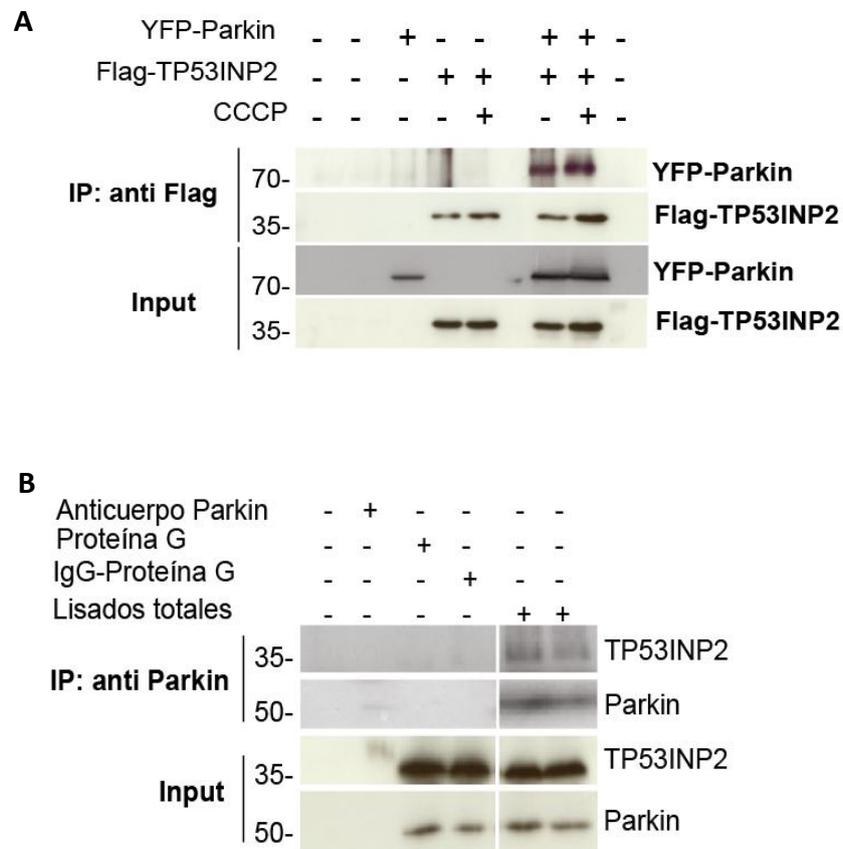


Figura 48. TP53INP2 y Parkin interaccionan físicamente. (A) Extractos provenientes de células HEK 293 transfectadas con YFP-Parkin y Flag TP53INP2 y el vector vacío pcDNA3 solos o en combinación fueron sometidos a inmunoprecipitación (IP) a través de un gel de afinidad denominado anti Flag M2. Posteriormente el *input* y las fracciones inmunoprecipitadas fueron analizadas por western blot utilizando los anticuerpos indicados. (B) Células HEK no transfectadas fueron sometidas a inmunoprecipitación con anticuerpos anti Parkin o control IgG, seguidamente se analizó el *input* y las otras fracciones con los anticuerpos indicados para demostrar la interacción física de Parkin y TP53INP2 endógeno (estos experimentos fueron realizados por la Dra. Saadet Turkseven).

g) TP53INP2 interactúa con una forma corta de Parkin y pierde la interacción con una forma mutante de Parkin

A continuación, estudiamos la interacción de TP53INP2 y algunas formas mutantes de Parkin. Estos mutantes los generamos en el laboratorio y en la sección de Materiales y métodos se describe el protocolo utilizado para este propósito.

Uno de los mutantes generados carece del dominio UBL (Δ UBL Parkin). Como se explicó en otro apartado este dominio es responsable del estado de autoinhibición de Parkin que a través de interacciones iónicas e hidrofóbicas bloquea el sitio de

reconocimiento para la enzima E2 importante en el mecanismo de ubiquitinación. La otra forma de Parkin utilizada tiene una mutación en el aminoácido responsable de la formación de un intermediario de unión y transferencia posterior de la ubiquitina al sustrato, se trata de la cisteína 431 (Parkin C431A).

Inicialmente se estudio la distribución y localización de Δ UBL Parkin en células HeLa MitoDsRed (Figura 49). Al igual que la forma *wild type*, esta forma corta de Parkin se observa distribuido a través de toda la célula en condiciones basales, sin embargo a veces puede observarse la formación de pequeños agregados. Así también después de la incubación con CCCP se observa formación de agregados, pero estos no parecen localizarse en las mitocondrias.

Una vez estudiada la distribución de Δ UBL Parkin se procedió a analizar la localización de TP53INP2 en las mismas condiciones, células HeLa MitoDsRed transfectadas con Δ UBL Parkin y TP53INP2 (Figura 50). Sorprendentemente, en estas condiciones no se observa reclutamiento de TP53INP2 fuera del núcleo después de la incubación con el agente despolarizante CCCP a 3h y 6h. Además la superposición de imágenes parece indicar interacción entre ambas proteínas.

Seguidamente estudiamos la interacción física de TP53INP2 y Δ UBL Parkin. Para ello se transfectaron células HeLa con pcDNA3, *wild type* Parkin, Δ UBL Parkin y TP53INP2. Utilizamos *wild type* Parkin como control y también para verificar que Parkin unido a otro *tag* (Flag) es capaz de interactuar nuevamente con TP53INP2 (Figura 51).

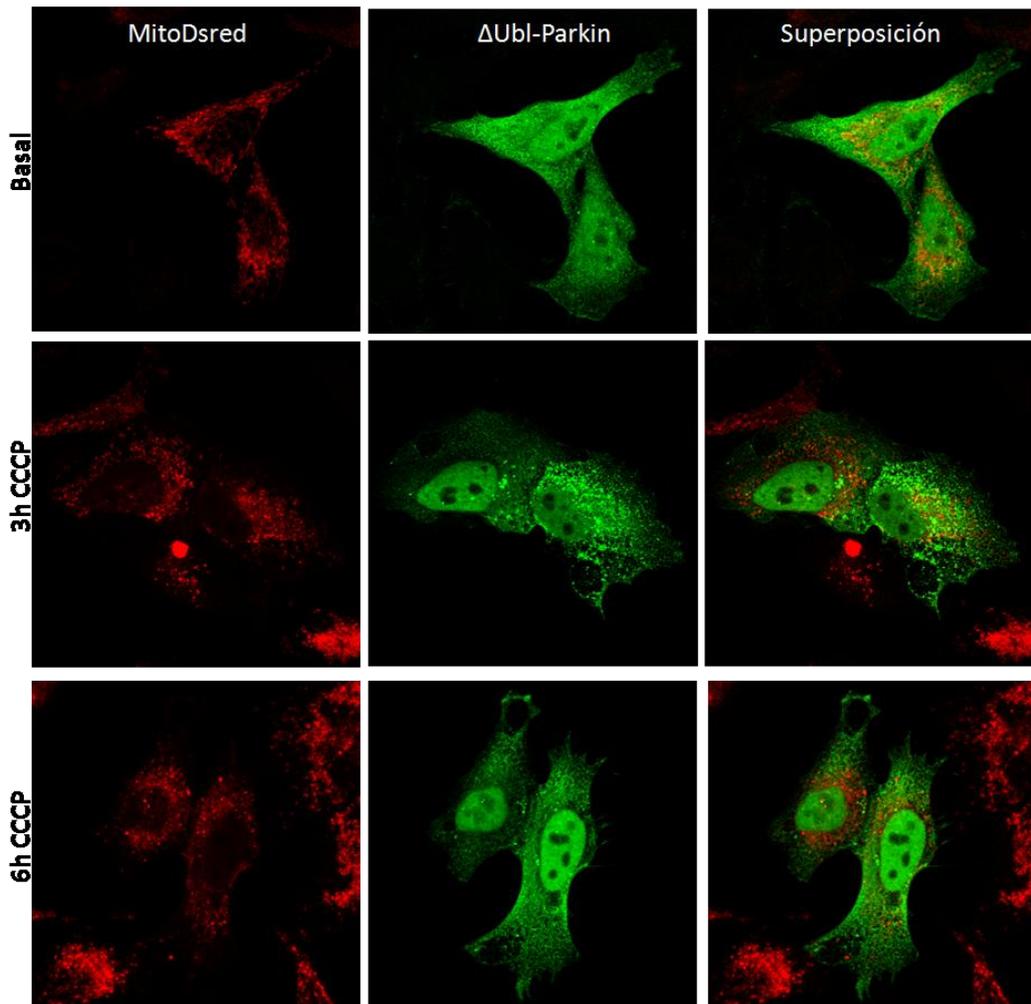


Figura 49. Distribución de ΔUBL Parkin. Células HeLa que expresan de manera estable MitoDsRed fueron transfectadas con ΔUBL Parkin, 24 horas después fueron incubadas con medio o medio conteniendo CCCP 30 μ M. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con anticuerpo anti Flag (verde). Se muestran las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

La Figura 51 demuestra que TP53INP2 y ΔUBL Parkin interactúan físicamente en condiciones basales y después de la incubación de 6 horas con el agente despolarizante CCCP. La forma “wild type” de Parkin también inmunoprecipita con TP53INP2. No obstante, llama la atención los niveles bajos de inmunoprecipitado de la forma ΔUBL Parkin. Parte de esta porción de proteína no inmunoprecipitada se observó en el sobrenadante.

Respecto a la forma mutante Parkin C431A, inicialmente se analizó su distribución en condiciones basales y de daño mitocondrial. En la Figura 52, se puede observar que la proteína mutante se encuentra distribuida en toda la célula pero que a diferencia de la forma “wild type”, después de la incubación con CCCP no se recluta a la mitocondria y tampoco forma agregados.

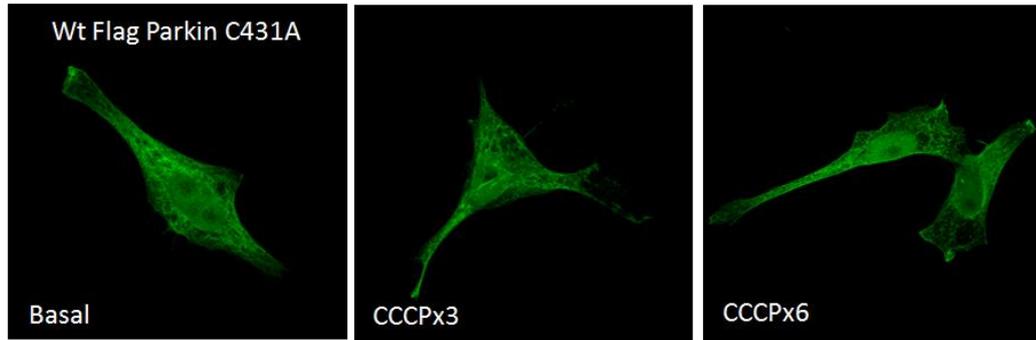


Figura 52. Localización y distribución de *wild type* Parkin C431A. Las células HeLa fueron transfectadas con *wild type* Parkin C431A, 14 horas después se incubaron con medio con o sin CCCP 30 μ M. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con el anticuerpo anti Flag (verde). Se muestran las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

A continuación se analizó el efecto de la sobreexpresión de la forma mutante de Parkin en la localización de TP53INP2. Tal como se aprecia en la Figura 53, en condiciones basales, TP53INP2 se encuentra principalmente en el núcleo y después de 3 y 6h de incubación con el agente despolarizante se observa en el núcleo y parcialmente en el citosol.

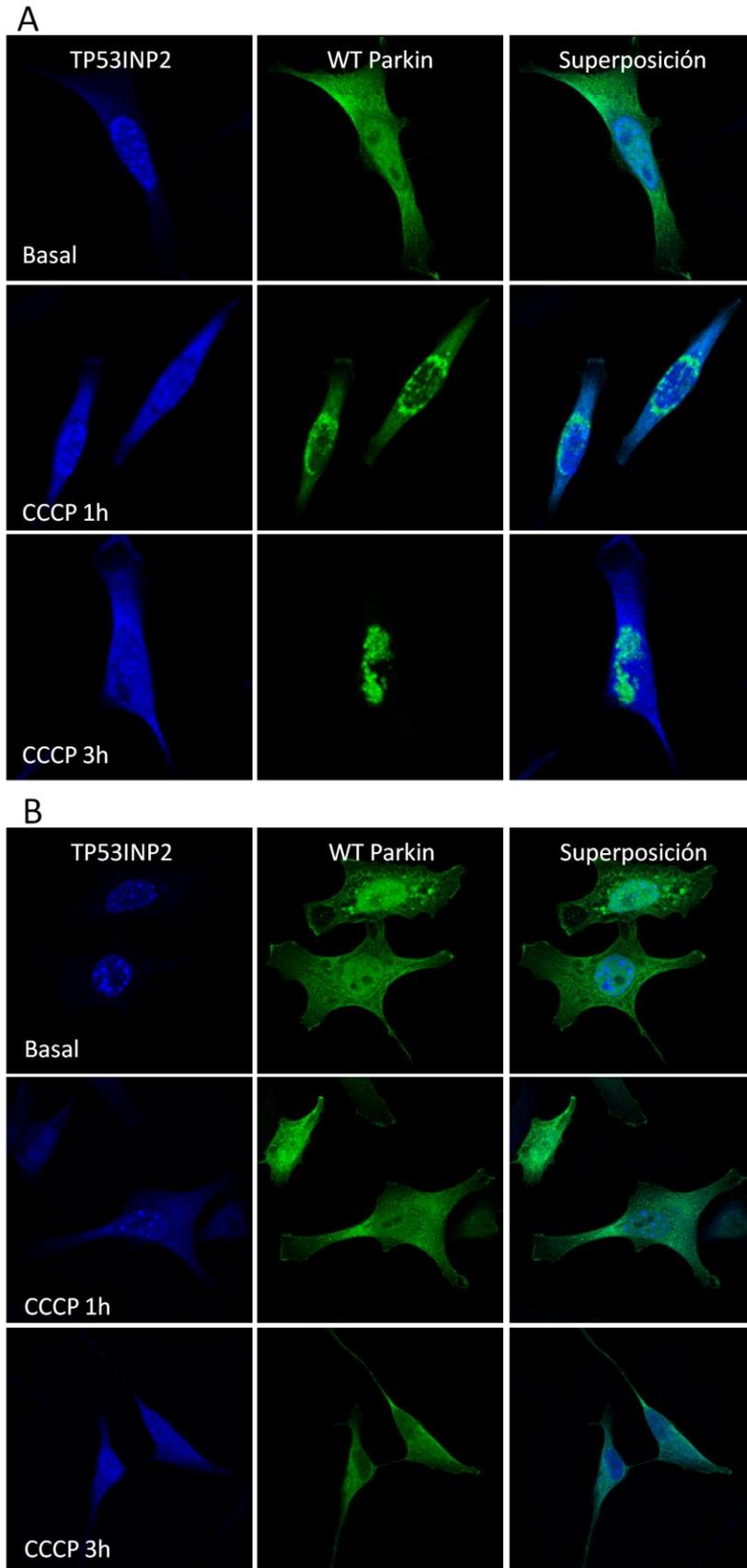


Figura 53. TP53INP2 es parcialmente reclutado fuera del núcleo en presencia de *wild type* Parkin C431A. Las células HeLa transfectadas con TP53INP2, "wild type" (A) y Parkin C431A (B), 24 horas después fueron incubadas con medio o medio conteniendo CCCP 30 μ M. Posteriormente las células

Capítulo 4. Discusión

DISCUSIÓN

TP53INP2 es una proteína que se encuentra principalmente en el núcleo pero se desplaza constantemente entre el núcleo y el citosol (Mauvezin et al., 2012). Con respecto a la función que desempeña TP53INP2 en el citosol, se sabe que ésta participa en la autofagia no selectiva a través de la interacción con algunas de las proteínas miembros de la familia ATG8 (Mauvezin et al., 2010), fundamentales porque sirven como una plataforma de interacción debido a su localización en la membrana de los fagóforos (Klionsky & Schulman, 2014). La secuencia responsable de dicha interacción es la presencia de un motivo peptídico LIR en TP53INP2. Además, hace sólo un par de años se describió que TP53INP2 se encuentra involucrada en la degradación de proteínas ubiquitiladas, gracias a estudios de microscopia e inmunoprecipitación se demostró que TP53INP2 colocaliza con agregados proteicos ubiquitilados e interacciona con ubiquitina, de esta manera promueve la degradación de proteínas ubiquitiladas (Sala et al., 2014).

Tanto la presencia de una secuencia LIR, así como también la capacidad de interacción con ubiquitina y proteínas ubiquitiladas concuerdan con las características descritas para otras proteínas clasificadas como receptores autofágicos. Sin embargo, la degradación de TP53INP2 por el sistema de proteasoma (Mauvezin et al., 2010) difiere en el mecanismo de degradación de estos receptores, el cual ocurre a través de autofagia.

Por otra parte, a día de hoy, sólo existe una mención del efecto de TP53INP2 en las mitocondrias (Sala et al., 2014). Los autores de esta investigación señalan que TP53INP2 no tiene ningún efecto en el contenido mitocondrial ni en la funcionalidad de las mitocondrias. Estas conclusiones fueron establecidas al estudiar los niveles de porina por western blot en homogenados provenientes de cuádriceps de ratones transgénicos y knockdown de TP53INP2 y la tinción con succinato dehidrogenasa de las secciones transversales de músculo provenientes de ambos modelos (Sala et al., 2014).

A pesar de lo reportado por Sala, *et al.*, en la presente tesis doctoral creímos conveniente estudiar el papel de TP53INP2 en la función mitocondrial y de manera más específica en la autofagia selectiva, concretamente en la mitofagia puesto que este es el proceso autofágico selectivo más estudiado. De este modo, con el propósito de establecer que el efecto de TP53INP2 ocurre a través de la degradación se evaluaron diferentes parámetros de la biología mitocondrial.

1. TP53INP2 regula la biología mitocondrial

1.1. Sobreexpresión de TP53INP2

A través del análisis de diferentes parámetros de la biología mitocondrial se determinó que la sobreexpresión de TP53INP2 en células HeLa YFP-Parkin induce un incremento de la masa mitocondrial, no obstante las mitocondrias presentes en este modelo no son competentes funcionalmente puesto que presentan un potencial de membrana menor respecto al control, es decir muestran una alteración del potencial eléctrico y la síntesis de ATP. Asimismo se mostraron más sensibles al estrés oxidativo provocado por antimicina. Para complementar la información de la funcionalidad de estas células se analizó la respiración mitocondrial inhibiendo proteínas clave de la cadena respiratoria y la síntesis de ATP. Cada uno de estos parámetros se encontró disminuido respecto al control por lo que nuevamente se confirmó que la funcionalidad de las mitocondrias se ve disminuida por la sobreexpresión de TP53INP2. Además, la ausencia de cambios en los niveles de RNA mensajero de PGC-1 α y NRF1, ambos reguladores de la biogénesis mitocondrial, confirmaron que el incremento del número de mitocondrias no guarda relación con un aumento de la biogénesis. Aunque los niveles del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) se encuentran elevados con respecto al control, creemos que esto se debe principalmente al incremento del número de mitocondrias, puesto que como se sabe TFAM es codificado en el núcleo, sintetizado en el citosol y transportado a la mitocondria, donde organiza el ADN mitocondrial en unas estructuras compactas denominadas nucleoides (Ngo et al., 2014). Por lo tanto, suponemos que el incremento de la masa mitocondrial está relacionado con una alteración a nivel de la degradación.

Los resultados obtenidos en este modelo no fueron los esperados puesto que creíamos que TP53INP2 al igual que incrementa la degradación proteica en la autofagia general (Mauvezin et al., 2010), induciría un aumento de la remoción de las mitocondrias.

1.2. Knockdown de TP53INP2

En la sección de resultados se explicó porque se utilizó este modelo como control negativo del impacto de TP53INP2 en la función mitocondrial. A diferencia de la sobreexpresión de TP53INP2 en estas células se encontró un pequeño incremento de la masa mitocondrial y una

disminución del potencial de membrana, no así cambios significativos en la producción de superóxido en ensayos de incubación con antimicina. Asimismo, cuando se analizó en profundidad otros parámetros como la respiración mitocondrial, no se encontró diferencias significativas en la respiración basal, pero tras la adición de oligomicina, es decir la inhibición de la enzima ATP sintetasa, se observó una ligera disminución de la respiración asociada a la síntesis de ATP, que sin embargo no es significativa. Seguidamente, en ausencia del consumo de ATP, la respiración mitocondrial controlada por la entrada pasiva de H^+ a través de la membrana mitocondrial o proton leak se encontraba elevada significativamente. Los otros parámetros no mostraron diferencias.

Capítulo 5. Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Cultivos celulares

- Medio DMEM (*Gibco* nº catálogo 41966-029) 4,5 g/L D-Glucosa, L-Glutamina y Piruvato.
- *Foetal Bovine Serum* inactivado por calor (*Gibco*, nº catálogo 10270106).
- Penicilina / Streptomycin 10,000 u/mL (*Gibco*, nº catálogo 15140122).
- HEPES 1,25 M, pH 7,4 (*Sigma-Aldrich* nº catálogo H4034).
- Tripsina-EDTA 0.05% (*Gibco*, nº catálogo 25300062).
- PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM ajustado a pH 7,4 con HCl).
- DMSO(*Sigma-Aldrich*, nº catálogo D2650)

1.2. Transfección

- PEI (*Polyscience*, nº catálogo 23966). Preparar una solución 1mg/mL ajustado a pH 7 y posteriormente filtrado en campana de flujo laminar utilizando filtro 0,2 mm.
- Los plásmidos utilizados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Plásmidos utilizados para transfectar

Nombre	Especie	Tag	Mutación/delección	Resistencia bacteriana
mDOR	<i>Mus musculus</i>			Ampicilina
NES DOR	<i>Mus musculus</i>		L36A/I37A/I38A/L40A	Ampicilina
Flag-DOR		Flag (N-terminal)		
Gal4-hDOR	<i>Homo sapiens</i>	Gal4 (N-terminal)		Ampicilina
Gal4-hDOR 1-120	<i>Homo sapiens</i>	Gal4 (N-terminal)	121-220	Ampicilina

Gal4-hDOR 120-220	<i>Homo sapiens</i>	Gal4 (N-terminal)	1-119	Ampicilina
GFP-LC3		GFP (N-terminal)		Kanamicina
CFP-LC3		CFP (N-terminal)		Ampicilina
pcDNA3				Ampicilina
GFP		GFP (N-terminal)		Ampicilina
YFP-Parkin	<i>Homo sapiens</i>	eYFP (N-terminal)		Kanamicina
pRK5-Myc-Parkin	<i>Homo sapiens</i>	Myc (N-terminal)		Ampicilina
WT Parkin	<i>Homo sapiens</i>	Flag (N-terminal)		Ampicilina
Δ UblParkin	<i>Homo sapiens</i>	Flag (N-terminal)	1-80	Ampicilina
WT Parkin C431A	<i>Homo sapiens</i>	Flag (N-terminal)	C431A	Ampicilina
Δ UblParkin C431A	<i>Homo sapiens</i>	Flag (N-terminal)	C431A/ 1-80	Ampicilina

1.3. Amplificación de adenovirus

Los datos correspondientes al adenovirus utilizado se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Adenovirus utilizado

Nombre	Vector	Inserto	Selección	Fuente	Observaciones
pAd-FLAG-mDOR	pAdeno/CMV/V5-dest	FLAG-mDOR	Ampicillin	Ana Sancho	Gateway cloning

1.4. Titulación de adenovirus

- Mouse monoclonal antibody raised against hexon antigen of Adenovirus (Santa Cruz, nº catálogo sc-51748), Dilución 2:500
- Vectastain ABC kit (*Vector Laboratories*, nº catálogo PK-6200):
Biotinylated, Universal (Anti-Mouse IgG/Rabbit IgG) Antibody
Reagent A (Avidin DH)

Reagent B (Biotinylated Horseradish Peroxidase H)

- Liquid DAB + substrate (DAKO, nº catálogo K3468)

1.5. Generación e infección con lentivirus

- Los plásmidos utilizados en la generación de los lentivirus se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en la infección lentiviral

Nombre	Vector	Selección	Fuente	Función
pLKO.1	pLKO.1	Ampicilina	MISSION® shRNA, Sigma Life Science	
TRCN000007097	pLKO.1	Ampicilina	MISSION® shRNA, Sigma Life Science	shRNA PINK1
TRCN000007098	pLKO.1	Ampicilina	MISSION® shRNA, Sigma Life Science	shRNA PINK1
TRCN000007100	pLKO.1	Ampicilina	MISSION® shRNA, Sigma Life Science	shRNA PINK1
TRCN000007101	pLKO.1	Ampicilina	MISSION® shRNA, Sigma Life Science	shRNA PINK1
psPAX2	psPAX2	Ampicilina	Donado por Didier Trono	empaquetamiento
pCMVDR7.8	pCMV	Ampicilina		empaquetamiento
pMD2.G	pMD2.G	Ampicilina	Donado por Didier Trono	Envoltura
pLVTHM scr	pLVTHM	Ampicilina		
pLVTHM Si6	pLVTHM	Ampicilina		shRNA TP53INP2
pLVTHM Si11	pLVTHM	Ampicilina		shRNA TP53INP2

- Polybrene (Sigma, nº catálogo H9268)
- Puromicina (*Santa Cruz*, nº catálogo sc-108071b)

1.6. Material para análisis de proteínas

- Tampón RIPA
150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 1% deoxicolato de sodio, 5 mM EDTA. Ajustar todo a pH 7,2.
- cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (*Roche*, nº catálogo 11836153001), disolver una pastilla en 10 mL de tampón RIPA.
- Inhibidores de fosfatasas:
Na₄P₂O₇ 0,5 M (usar 50 µL/mL)
Na₃VO₄ 0,2 M (usar 50 µL/mL)
NaF 1M (usar 50 µL/mL)
- Kit Pierce™ BCA Protein assay (*Thermo Fisher Scientific*, nº catálogo 23225)
- Tampón de carga 4x
62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8 ,10% glycerol 1% SDS 0.005% Bromophenol Blue.
- DTT (DL-Dithiothreitol) (*Sigma* nº, catálogo D0632-25g).
- Geles de acrilamida, ver tabla 4.

Tabla Nº 4. Preparación de geles de acrilamida

	Separador			Compactador
	15 %	12,5 %	10 %	4 %
H2O dest (mL)	2,275	3,125	3,95	3,0
Tris 1,5 M (mL)	2,5	2,5	2,5	0
Tris 0,5 M (mL)	0	0	0	1,25
Acrilamida 30% (mL)	5,025	4,175	3,35	0,665
SDS 10% (µL)	100	100	100	50
APS (µL)	100	100	100	50
TEMED (µL)	10	10	10	5

- Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (*Life technologies*, nº catálogo 26623)
- Tampón de electroforesis 10x
Tris base 247 mM, Glicina 1,9M, SDS 1%, pH 8,3 (no se necesita ajustar)
- Tampón de transferencia (1x)
Tris base 25mM, Glicina 200 mM, pH=8,3; metanol 20%.
- Membrane Immobilon-P, PVDF; 0,45 µm (*Millipore*, nº catálogo IPVH00010).
- Tween® 20 (*Sigma*, nº catálogo P5927-500ML)

- Asturiana, leche en polvo descremada. Solución de leche al 5% diluido en tampón de lavado.
- Solución de lavado PBS-Tween (200 mL de H₂O destilada, 800 mL de PBS 5x y 1 mL de Tween® 20)
- Anticuerpos (Ver Tabla 5 y 6)
- ECL Western Blotting Detection Reagents (*GE Healthcare Life Sciences*, nº catálogo RPN2106)
- Amersham Hyperfilm ECL(*GE Healthcare Life Sciences*, nº catálogo28-9068-37)
- RX SUPER BLUE MOVIES 18X24 (nº catálogo SHRGH1824B)

Tabla 5. Anticuerpos primarios

Nombre	Obtenido en	Clonalidad	Especies reconocidas	Dilución	Fabricante	Nº catálogo
PINK1	Conejo	Policlonal	Humano, ratón, rata	1:500	Novus Biologicals	BC100-494
Parkin	Ratón	Monoclonal	Humano, ratón, rata	1:1000	Santa Cruz Bio.	SC-32282
TP53INP2	Ratón	Monoclonal	Humano, ratón, rata	1:500	Generado en el laboratorio	
TOM20	Ratón	Monoclonal	Humano, rata	1:1000	BD Biosciences	612278
TIM44	Ratón	Monoclonal	Humano, ratón, rata	1:1000	BD Biosciences	612582
Mitofusin 2	Ratón	Monoclonal	Humano, ratón, rata	1:1000	Abcam	ab56889
UbiquitinMono- and polyubiquitinylatedconjugates monoclonal antibody (FK2)R	Ratón	Monoclonal		1:1000	Enzo	BML-PW8810
Double and single-stranded DNA	Ratón	Monoclonal	Todas las especies		Progen	61014
Flag	Ratón	Monoclonal			Sigma	F3165
Phospho-ubiquitin (Ser65)	Conejo	Policlonal	Humano	1:1000	Millipore	ABS1513

Tabla 6. Anticuerpos secundarios

Nombre	Obtenido en	Clonalidad	Especies reconocidas	Dilución	Fabricante	Nº catálogo
α-Tubulin	Ratón	Monoclonal	Humano, ratón,	1:8000	Sigma	T5168

			rata			
β-actina	Ratón	Monoclonal	Humano, ratón, rata	1:8000	Sigma	A1978

1.7. Inmunoprecipitación

- ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (*Sigma*, nº catálogo A2220)
- Tampón de lisis
50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON X-100.
Antes de utilizar se debe añadir un coctel de inhibidor de proteasas sin EDTA
- Tampón de lavado 10x
0,5 M Tris HCl pH 7,4; 1,5 M NaCl
- 3x Flag peptide(*Sigma*, nº catálogo F4799)
Disolver 3X FLAG peptide en 0.5 M Tris HCl, pH 7.5, con 1 M NaCl a una concentración de 25 mg/mL. Diluir 5 veces con agua para obtener una solución stock de 5 mg/mL de 3X FLAG peptide.
- Solución TBS (50 mM Tris HCl, con 150 mM NaCl, pH 7.4)

1.8. Transformación y Purificación

- Células competentes XL-1Blue
- Medio LB
- Ampicilina (*Roche*, nº catálogo 10835269001)
- Kanamicina (*Sigma*, nº catálogo K0129-20M)
- NucleoBond Xtra Maxi (10) (*Macherey- Nagel*, nº catálogo 740414.10)

1.9. Extracción de RNA

- PureLink® RNA Mini kit (*Life technologies*, nº catálogo 12183018A)
- PureLink® DNase Set (*Life technologies*, nº catálogo 121885010)
- 2- mercaptoetanol (*Sigma*, nº catálogo M7522)

1.10. Retrotranscripción inversa

- Oligo(dT)₂₀ Primer, 15 µg (50 µM) (*Invitrogen*, nº catálogo 18418020)
- RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (*Invitrogen*, nº catálogo 10777-019)
- H₂O RNase free
- dNTP Set (100 mM) (*Invitrogen*, nº catálogo 10297018)
- Kit comercial (*Invitrogen*, nº catálogo 18064014)
 - 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3 a temperature ambiente; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂)

- 0.1 M DTT
- SuperScript™ II RT

1.11. Extracción de DNA

- DNeasy Blood & Tissue Kit (*Qiagen*, nº catálogo 69582)

1.12. rtPCR

- Power SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*, nº catálogo 4368702)
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*, nº catálogo 4304437)
- Las sondas TaqMan® utilizadas se muestran en la Tabla 7 y los primers utilizados para SYBR® Green se muestran en la Tabla 8.

Tabla 7. Sondas TaqMan®

Nombre	Referencia	Longitud del amplicon
PPARGC1A	Hs01016721_m1	80
PINK1	Hs00260868_m1	104

Tabla 8. Primers utilizados para rtPCR utilizando SYBR® Green

Gen de interés	Orientación del primer	Secuencia
<i>Human ACTB</i>	<i>Forward</i>	5'-TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3'
<i>Human ACTB</i>	<i>Reverse</i>	5'-GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'
<i>Human MTCO2</i>	<i>Forward</i>	5'-ACGGCGGACTAATCTTCAAC-3'
<i>Human MTCO2</i>	<i>Reverse</i>	5'-CGATTGTCAACGTCAAGGAG-3'
<i>Human TFAM</i>	<i>Forward</i>	5'-GACTTCTGCCAGCATAATAC-3'
<i>Human TFAM</i>	<i>Reverse</i>	5'-GAGTTCTGCCTGCTTTATG-3'
<i>RatTFAM</i>	<i>Forward</i>	5'-GCAGGCATATATTCAGCTTGCTAA-3'
<i>RatTFAM</i>	<i>Reverse</i>	5'-GATGAGATCACTTCGCCCAACT-3'
<i>HumanNRF1</i>	<i>Forward</i>	5'-GCACCTTTGGAGAATGTGGT-3'
<i>HumanNRF1</i>	<i>Reverse</i>	5'-CTGAGCCTGGGTCATTTTGT-3'

Mouse PPARGC1A	<i>Forward</i>	5'-AGCCGTGACCACTGACAACGAG-3'
Mouse PPARGC1A	<i>Reverse</i>	5'-GCTGCATGGTTCTGAGTGCTAAG-3'
MouseGAPDH	<i>Forward</i>	5'-CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA-3'
MouseGAPDH	<i>Reverse</i>	5'-GCGGCACGTCAGATCCA-3'
RatMt	<i>Forward</i>	5'-CAAACCTTTCCTGCACCTCC-3'
RatMt	<i>Reverse</i>	5'-AGGCGTTCTGATGATGGGAA-3'
RatNuc	<i>Forward</i>	5'-GTTCCCGCCTTCTTCTCTG-3'
RatNuc	<i>Reverse</i>	5'-GTTTGCTTGCCGACTCCTTG-3'
PARKIN	<i>Forward</i>	5'-CTTGGTACTCGCTGCCGTGTGT-3'
PARKIN	<i>Reverse</i>	5'-TACCTGTTGTACTGCTCTTCTCC-3'

1.13. Generación de una forma corta de Parkin (Δ UBL)

- DNA Polimerasa 5000 U, 5 U/ μ L (incl. 10x Standard Reaction Buffer with MgCl₂) (*Biotoools*, nº catálogo 10043-4107)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (*Macherey- Nagel*, nº catálogo 22740609.50)
- Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix (*Invitrogen*, nº catálogo 56481)
- Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (*Invitrogen*, nº catálogo 11791020)
- Gateway® pDONR® 221 vector (*Invitrogen*, nº catálogo 12536017)
- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*, nº catálogo 4337454)
- NucleoSpin Plasmid NoLid (*Macherey- Nagel*, nº catálogo 22740499.25)

1.14. Generación de mutantes de Parkin (wt C431A y Δ UBL C431A)

- QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (*Agilent Technologies*, nº catálogo 200518)

Tabla 9. Primers utilizados para generar la forma corta Δ Ubl Parkin y para mutar Parkin

Nombre	Orientación	Secuencia
Parkin OK	<i>Forward</i>	5'-CAAGGAAACACCAGTAGCTTTG-3'
Parkin OK	<i>Reverse</i>	5'-CAAAGCTACTGGTGTTCCTTG-3'
Parkin C431A	<i>Forward</i>	5'-AAAAAATGGAGGCGCCATGCACATGAAG-3'
Parkin C431A	<i>Reverse</i>	5'-CTTCATGTGCATGGCGCCTCCATTTTTT-3'
FlagParkinwt	<i>Forward</i>	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGATAGTGTTTGT CAGGTTCAAC- 3'
FlagParkindeltaUbl	<i>Forward</i>	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGTCAAGAAATGAATGCAACT- 3'
FlagParkin	<i>Reverse</i>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTACACGTCGAACCAAGTGGTCCCC-3'

1.15. Inmunofluorescencia

- Paraformaldeído 4% (*Santa Cruz*, nº catálogo sc-281692)
- Tritón® X-100 (*Sigma*, nº catálogo 28314)
- Solución de FBS al 3%, esta solución se prepara diluyendo FBS en PBS 1x.
- Solución Hoechst, se prepara diluyendo Hoechst a una concentración de 10 µg/mL en PBS 1x.
- Fluoromont® (*Sigma*, nº catálogo F4680)
- Los anticuerpos secundarios utilizados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia

Nombre	Obtenido en	Excitación máxima	Emisión máxima	dilución	Fabricante	Nº Catálogo
Pacific blue	rabbit	410	455	1/200	Molecular probes	
Alexa 488	Mouse/rabbit	469	519	1/200	Molecular probes	
Alexa 568	Mouse/rabbit	578	603	1/200	Molecular probes	
Alexa 647	Mouse/rabbit	650	665	1/200	Molecular probes	
Hoechst		361	497	10 µg/mL		

1.16. Tinción con Mitotracker Deep Red

- MitoTracker Dep Red (*Invitrogen*, nº catálogo M22426)

1.17. Análisis del potencial de membrana mitocondrial

- TMRM (*Life technologies*, nº 7668)
- CCCP (*Sigma*, nº C2759)

1.18. Determinación de la oxidación mitocondrial

- MitoSOX™ (*Invitrogen*, nº catálogo M36008)
- Antimicina (*Sigma*, A8674)

1.19. Respiración mitocondrial

- Medio Seahorse
 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (*Sigma*, nº catálogo D5030-1L), diluir en 500 mL de H₂O milliQ, por otra parte disolver 1,85 g de NaCl en 500 mL de H₂O milliQ. Combinar ambas soluciones y añadir 15 mg de Rojo de Fenol. Ajustar a pH7,2 utilizando NaOH. Filtrar utilizando filtro estéril de 0,2 µm. Guardar a 4°C. Este medio se suplementa el día del experimento con Glutamina 2mM (*Gibco*, nº 25030024) y Glucosa 5mM (*Sigma*, nº G7021).
- KIT (*Agilent Technologies*, nº catálogo 100850-001)
 - Seahorse XF Calibrant Solution (*Agilent Technologies*, nº catálogo 100840-000)
 - XF 24 sensor cartridges
 - XF24 cell cultures microplate
- Oligomicina (*Sigma*, nº 75351)
- FCCP (*Sigma*, C2920)
- Rotenona (*Sigma*, R8875)
- Antimicina A (*Sigma*, A8674)

2. Métodos

2.1. Cultivos celulares

2.1.1. Líneas celulares

Durante el desarrollo de la tesis se utilizaron diferentes líneas celulares las cuales mencionaré brevemente a continuación:

- HEK293T.- esta línea celular proviene de células embrionarias de riñón humano. Son relativamente fáciles de cultivar y transfectar. Estas células fueron proveídas al laboratorio tiempo atrás por los Drs. Daniel Bach y Didier Trono de la EPH de Lausana (Suiza).
- HEK293A.- esta línea celular proviene de un subclon de las células anteriores. Usualmente se utilizan para la producción de adenovirus. Las células HEK293A fueron transformadas con DNA de adenovirus, de tal forma que produce el gen E1 del Adenovirus en trans, y permiten la expresión de una proteína conocida como hexon y, por lo tanto, la producción de partículas víricas infecciosas cuando las células son transfectadas con vectores adenovirales con el gen E1 delecionado.
- HeLa.- esta línea celular proviene de un adenocarcinoma de cérvix, extraída a partir de una donante involuntaria, Henrietta Lacks. Son las células inmortalizadas más utilizadas en investigación debido a su fácil manipulación.
 - HeLa MitoDsred.- estas células fueron generadas en el laboratorio, poseen una proteína fluorescente roja DsRed (cedida por el Dr. Manuel Rojo del IBCG de Bordeaux) dirigida a la matriz mitocondrial.
 - HeLa YFP-Parkin.- estas células expresan de manera estable YFP-Parkin y fueron cedidas amablemente al laboratorio por el Dr. Richard Youle.
- L6E9.- esta línea es un clon de la línea L6, la cual fue obtenida por transformación química de un cultivo primario de gastrocnemius de ratas neonatas (Yaffe, 1968). Estas células fueron proveídas por el Dr. Nadal-Ginard.

La manipulación de las células requiere utilizar medios de cultivo, los cuales podrán variar su composición de acuerdo al tipo celular utilizado o si se desea inducir la diferenciación celular. En el caso de las células utilizadas durante la tesis la composición del medio de cultivo utilizado es el siguiente:

500 mL Medio DMEM.
50 mL *Foetal Bovine Serum* inactivado por calor.
5 mL Penicilina / Streptomicina
10 mL HEPES 1,25 M, pH 7,4.

Asimismo, es importante que el manejo de las células se realicen en condiciones estériles, por este motivo es importante activar el ultravioleta en la cabina de flujo laminar durante 10 minutos antes de comenzar a trabajar, posteriormente es necesario limpiar mediante aspersion con alcohol de 70° los objetos que serán colocados en el interior de la cabina.

Antes de comenzar es conveniente calentar en baño a 37°C el medio de cultivo y la tripsina-EDTA, así como también la observación de las células al microscopio.

2.1.2. Procedimientos habituales durante la manipulación de células

Durante la manipulación de células es bastante usual utilizar ciertos procedimientos de manera rutinaria, como por ejemplo el conteo de células, para determinar el número exacto de células, la congelación de células, para mantener los stocks de las células de trabajo, pruebas de *Mycoplasma*, para saber si las células podrían haberse contaminado, entre otras.

2.1.2.1. Tripsinización y conteo de células: a continuación describo brevemente el procedimiento utilizado para realizar un pase y el conteo celular, utilizando la cámara de Neubauer, el cual consiste en un portaobjeto que tiene una cuadrícula de dimensiones conocidas.

- Aspirar el medio utilizando el vacío de la cabina de flujo laminar. Lavar las células con una alícuota de tampón fosfato salino, llamado PBS para remover los restos de suero (FBS) que contiene el medio.
- Añadir un volumen de tripsina a la placa y posteriormente incubarla durante entre 3 y 5 minutos a 37°C. La tripsina es una enzima proteolítica que junto con el EDTA (un agente quelante o secuestrador de calcio) rompe y desestabiliza los componentes proteicos de la matriz extracelular, los cuales son fundamentales para la adhesión célula-célula y placa-célula.

- Al cabo del tiempo señalado es posible observar al microscopio que las células se encuentran suspendidas. Seguidamente, es necesario añadir medio con FBS para neutralizar la actividad de la tripsina, el volumen añadido debe ser el mismo que se utilizó de tripsina. A continuación, se debe retirar la suspensión celular a un tubo falcón.
- Para poder realizar el conteo celular es necesario hacer diluciones previas, las cuales dependerán de la confluencia de las células, por ejemplo: si las células cubren la totalidad del área de superficie de la placa estamos refiriéndonos a una confluencia del 100 %, por lo que será necesario hacer más de una dilución. Las diluciones deben realizarse tomando 60 μ L de medio y añadiendo 30 μ L de la suspensión celular, luego se debe homogenizar. Para una dilución posterior se debe tomar 30 μ L de la dilución anterior y añadir 60 μ L de medio. Antes de cargar la cámara de Neubauer es importante homogenizar bien la dilución final.
- Al microscopio se observará 4 cuadrantes compuestos de 16 cuadrados, en los cuales se deberá determinar el número de células. Es importante no considerar las células que se encuentren en medio de las líneas fronterizas que conforman los cuadrantes.
- Una vez se ha definido el número de células es importante hallar el promedio, luego este valor deberá multiplicarse por el factor de dilución que es 3, en caso se hayan realizado varias diluciones cada una de ellas debe ser considerada y deberá multiplicarse nuevamente por 3. A continuación se debe multiplicar por 10000, este valor hace referencia al volumen de la cámara, finalmente se deberá multiplicar por el volumen final de la suspensión (volumen de tripsina más el volumen de medio utilizado para inactivar la tripsina).

$$X \times 3 \times 10000 \times \text{volumen final} = N^{\circ} \text{ total células}$$

X= promedio de células de los 4 cuadrantes

3= factor de dilución

- Finalmente a partir del número de células se puede realizar la siembra del número necesario de células para el experimento.

2.1.2.2. Congelación y descongelación de células: La congelación de células es un procedimiento que nos permite mantener un stock de las células de trabajo o una reserva de células óptimas. El procedimiento es el siguiente:

- Tripsinizar la placa de células confluentes (tal como se describió en la sección de contaje de células), luego de obtener la suspensión es necesario centrifugarla a 1500 rpm ó 600 xg durante 5 minutos.
- Seguidamente se aspira el medio y se resuspende las células en una solución de DMSO al 10%. La solución de DMSO al 10% debe haber sido preparada previamente con el medio de mantenimiento utilizado normalmente para las células. Es importante tener en cuenta que cuando se prepara esta solución se desprende calor por lo que la solución puede estar caliente, es mejor utilizarla fría.
- Luego de resuspender las células se distribuye la suspensión en criotubos previamente rotulados. Después se colocan los criotubos en un StrataCooler, este dispositivo contiene en su interior isoprano y permite una congelación gradual de la suspensión celular, de esta manera evita la formación de cristales debido a un congelamiento rápido y por lo tanto daño celular.
- Se coloca el StrataCooler en el congelador a -80°C. Al día siguiente se retiran los criotubos del StrataCooler y se colocan en una caja convenientemente rotulada, si se necesita mantener stocks en nitrógeno se puede colocar los criotubos en el tanque de nitrógeno líquido.

El proceso de descongelación debe ser rápido para evitar el efecto tóxico del DMSO en las células.

- En la campana de flujo laminar se coloca el medio de trabajo en un tubo Falcon, aproximadamente 5 mL. El medio debe haber sido calentado previamente a 37°C.
- Descongelar el criotubo durante 1 a 2 minutos en el baño a 37°C, es conveniente no descongelarlo del todo.

- En la campana de flujo laminar, colocar la suspensión en el tubo Falcon previamente preparado y después centrifugar por 5 minutos a 1500 rpm ó 600 xg.
- Inmediatamente después aspirar el sobrenadante y resuspender el pellet de células con el medio de mantenimiento.

2.1.2.3. Detección de *Mycoplasma*: El *Mycoplasma* es uno de los contaminantes biológicos más frecuentes encontrados en los cultivos celulares, además debido a que son muy pequeños (menos de 1 μm) es muy difícil detectarlos visualmente en los microscopios convencionales, a diferencia de los hongos y otras bacterias. La contaminación por este organismo produce ciertos cambios celulares en el metabolismo, crecimiento e incluso aberraciones cromosómicas que pueden afectar el comportamiento normal de las células. Por esta razón en el laboratorio se desarrollan pruebas periódicas para detectar *Mycoplasma*. A día de hoy se emplea el método de (Uphoff & Drexler, 2011). Este procedimiento es llevado a cabo por el personal técnico del laboratorio.

2.1.3. Transfección

La transfección es una herramienta sumamente útil para el estudio celular de la función y regulación de los genes, así como también el análisis de la función de las proteínas. En este proceso se introduce material genético externo para producir células genéticamente modificadas de manera transiente o estable, esta característica dependerá del material genético. En el caso de la transfección transiente, el ADN y/o el ARN introducido son expresados por un período de tiempo limitado y no son integrados en el genoma, por esta razón el material genético transfectado puede ser perdido debido a factores ambientales o la división celular. Por el contrario, en la transfección estable el material genético es introducido en el genoma y es expresado de manera sostenida.

Existen numerosos métodos de transfección y cada uno de ellos utiliza diferentes enfoques que pueden ser clasificados como de tipo físico, químico y biológico. A continuación describo brevemente estos métodos.

- **Métodos físicos.**-corresponden a los métodos de más reciente utilización, además involucra el uso de diferentes herramientas físicas para la entrega de los ácidos

nucleicos. Estos métodos pueden ser la microinyección, la electroporación, la transfección mediada por láser, entre otros.

- **Métodos químicos.**-sin duda estos son los métodos más comúnmente utilizados. La transferencia del material genético se consigue utilizando diferentes agentes como: polímeros catiónicos, fosfato de calcio, liposomas y aminoácidos catiónicos. El principio de todos éstos es más o menos el mismo. La carga positiva de los agentes químicos les permite unirse a los ácidos nucleicos cargados negativamente, de esta manera forman complejos que posteriormente son endocitados por la célula. La eficiencia de estos métodos depende de muchos factores como el pH, la membrana celular, la proporción agente químico-ácido nucleico, etc., por estos motivos la eficiencia es bastante baja comparada a los métodos biológicos. Sin embargo presenta ciertas ventajas como baja citotoxicidad, ausencia de mutagénesis, etc.
- **Métodos biológicos.**- el método más utilizado es la transfección mediada por virus, comúnmente conocida como transducción. La eficiencia de este método es muy alta pero es tóxica para las células, además de presentar inmunogenicidad.

Durante el desarrollo de esta tesis se utilizaron el método químico y el método biológico. Seguidamente se describe la metodología aplicada en cada método.

2.1.3.1. Transfección transitoria utilizando el método químico

- Día 0. Sembrar las células. El número de células sembradas dependerá del tipo celular.
- Día 1. Es importante que el material que se va utilizar se encuentre a temperatura ambiente. Antes de preparar la solución que será utilizada para la transfección es recomendable observar las células al microscopio, si éstas se encuentran entre un 50 y 70% de confluencia se puede empezar a preparar la solución. Primero tomar el volumen requerido de NaCl 150 mM (1560 μ L), y a continuación añadir el plásmido (en la concentración deseada), homogenizar la solución y finalmente añadir el PEI (78 μ L), homogenizar nuevamente y dejar

reposar la solución durante 15-20 minutos. Al cabo de este tiempo se debe añadir la solución gota a gota sobre las placas de cultivo. Posteriormente se deberá cambiar el medio, entre 4 a 6 horas después de haber añadido la solución. Con esta técnica se obtiene porcentajes de transfección bajos.

2.1.3.2. Transducción (utilizando el método biológico)

En este apartado se describe el procedimiento seguido para la transducción, en la siguiente sección se describirá la amplificación y titulación de los adenovirus utilizados.

Es importante indicar además que todo el trabajo que involucraba la manipulación de adenovirus se realizó en una sala de cultivo con categoría de bioseguridad 2 y campana de bioseguridad nivel IIA.

La infección ideal (o aquella con la que se consigue una eficiencia ideal de transfección de genes) es dependiente del índice de infección específico de cada línea celular. Por ello antes de realizar la transducción es importante establecer la cantidad de virus necesario para inocular una célula o llamado también multiplicidad de la infección (MOI). Para establecer la cantidad efectiva de MOI, se realizó la transducción previa de las células utilizando diferentes cantidades de virus. Posteriormente, se examinó el nivel de la expresión de proteína de interés por western blot, así como también la viabilidad celular. De esta manera se estableció que 50 MOI era la cantidad apropiada para los experimentos. A continuación describo el procedimiento seguido para la infección con adenovirus.

- Día 1. Durante la mañana, se siembran 1 200 000 células. Entre 4 ó 5 horas después se realiza la infección con adenovirus. El volumen de adenovirus que se utiliza se calcula de la siguiente manera:

$$(MOI \times n^{\circ} \text{de células}) \div \left(\text{Unidades infecciosas} \frac{IFU}{mL} \right) \\ = \text{volumen de virus}(mL)$$

Para preparar la solución con los adenovirus se utiliza medio DMEM sin FBS, antes de añadir la solución anterior se lavan las células previamente con PBS.

- Día 2. Al día siguiente por la mañana se aspira el medio, se lavan las células y se añade medio de cultivo normal fresco.

- Día 4. A partir de este día las células se encuentran disponibles para el experimento programado.

2.1.4. Amplificación de adenovirus

El material vírico utilizado, fue previamente generado en el laboratorio mediante la clonación por recombinación con el sistema Gateway[®] de Invitrogen (Ana Sancho). Durante esta tesis se realizó la amplificación de estos adenovirus.

A continuación se describe la técnica utilizada:

1. Sembrar células HEK293A en placas de 56 cm². Las HEK293A son las células de elección para la amplificación de adenovirus dado que esta línea celular contiene los genes víricos Ad5 E1A y E1B que complementan la ausencia de esta región en el adenovirus y que además son esenciales para el ciclo lítico del adenovirus recombinante.
2. Al día siguiente cuando las células se encuentran a un 90% de confluencia se infectan las células con 100 µL del stock crudo de adenovirus.
3. Al siguiente día se observan las células al microscopio para observar el estado de infección de las células, esto se podrá apreciar gracias a los cambios morfológicos visibles al microscopio que produce el adenovirus durante su ciclo de reproducción en la célula. Esta serie de cambios se denomina efecto citopático. Normalmente esto ocurre entre las 24 y 48 horas.
4. Las células y el medio serán recogidos cuando el 80-90% de las células se encuentran llenas de virus, esto se reconoce debido a que las células adquieren una estructura redondeada y se observan al microscopio agrupadas como si fueran racimos de uvas, además se desenganchan fácilmente de la placa de cultivo. Este punto es sumamente crítico debido a que una recogida

temprana o tarde puede influir en la concentración final de los virus obtenidos. Las células y el medio se depositan en un tubo Falcón de 15 mL.

5. Una vez recogido el medio y las células, se procede a realizar ciclos de congelación y descongelación con el propósito de liberar los virus del interior de las células. Se realizan 3 ciclos de congelación y descongelación, 30 minutos a -80°C y 15 minutos a 37°C . Es importante no exceder los 15 minutos a 37°C , puesto que esta temperatura inactiva a los virus, el propósito de la incubación a 15 minutos es solo la descongelación, no se pretende calentar el medio por encima de la temperatura ambiente. Al terminar el último ciclo, se centrifuga el tubo a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se recoge el sobrenadante y se guarda a -80°C .
6. Nuevamente se siembran células HEK293A en placas de 100 mm de diámetro. Al día siguiente cuando se encuentran a un 90% de confluencia se remueve el medio y se adiciona 4 mL del sobrenadante de la amplificación previa (del paso 5). Luego se repiten los pasos 3, 4 y 5. Finalmente, después de la centrifugación del último ciclo de congelación y descongelación se recolecta el sobrenadante y se filtra utilizando un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$. Se guarda a -80°C .

2.1.5. Titulación de adenovirus

Es muy importante determinar con precisión los títulos del stock de virus para poder realizar con éxito la infección posterior en un tipo específico de célula. Por ello es necesario determinar el título de las partículas infectantes y para conseguir esto existen diferentes métodos. En esta tesis se siguió el protocolo de un kit comercial de titulación rápida (Adeno-X™ Rapid Titer Kit, Clontech). Este protocolo es mucho más rápido que los convencionales gracias a que utiliza un anticuerpo para reconocer una proteína de la cápside del adenovirus conocida como hexon que es necesaria para su replicación. Posteriormente se añade un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP) para amplificar la señal. La enzima HRP cataliza una reacción colorimétrica cuando se añade un tercer reactivo, la diaminobencidina (DAB), la cual produce la formación de un precipitado oscuro. Debido a que solo las células infectadas expresan la proteína hexon, son las únicas células en cultivo que contienen el precipitado oscuro, por lo que pueden contarse con un microscopio y calcular el título viral.

El protocolo seguido se describe a continuación:

1. En una placa de 24 pocillos se siembran aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células HEK293.
2. Aproximadamente 1 hora después se preparan diluciones del stock de adenovirus (obtenido en la sección 2.1.4) utilizando PBS 1x.

10 μ L adenovirus stock en 990 μ L PBS	= 10^{-2}
10 μ L dilución 10^{-2} en 990 μ L PBS	= 10^{-3}
10 μ L dilución 10^{-3} en 990 μ L PBS	= 10^{-4}
10 μ L dilución 10^{-4} en 990 μ L PBS	= 10^{-5}
10 μ L dilución 10^{-5} en 990 μ L PBS	= 10^{-6}
3. Se añaden 50 μ L de las diluciones anteriores a cada pocillo. Es conveniente realizar duplicados.
4. Seguidamente se incuba las células a 37°C, 5% CO₂ durante 48 horas.
5. Transcurrido ese tiempo, se aspira el medio, se deja secar un poco las células en la campana de flujo laminar.
6. Cuidadosamente para evitar que las células se despeguen se añaden 500 μ L de metanol frío.
7. Se incuba la placa a -20°C por 10 minutos.
8. Se aspira el metanol y se realiza 3 lavados con mucho cuidado utilizando 500 μ L de PBS+1%BSA.
9. Diluir el anticuerpo primario mouse anti hexon 1:500 en la solución PBS+1%BSA.
10. Aspirar la solución de lavado y añadir a los pocillos 0,25 μ L del anticuerpo primario preparado en el punto 9. Incubar 1h a 37°C.
11. Aspirar y lavar cuidadosamente con 500 μ L de PBS+1%BSA.
12. Diluir el anticuerpo secundario anti mouse conjugado a HRP. En este punto se realizó una modificación del protocolo puesto que no se disponía de este anticuerpo, por ello se utilizó un anticuerpo conjugado a biotina. Diluir el anticuerpo antimouse conjugado a biotina 1 gota en 10 mL de la solución PBS+1%BSA, añadir 250 μ L en cada pocillo. Incubar 30 minutos a 37°C.
13. En esta tesis para mejorar la sensibilidad del anticuerpo secundario se utilizó una mezcla de enzima HRP biotinilada + avidina (1:1). El incremento de la sensibilidad se debe al complejo formado entre la proteína tetramérica avidina y la biotina. Esta solución se prepara 30 minutos antes de utilizarla.

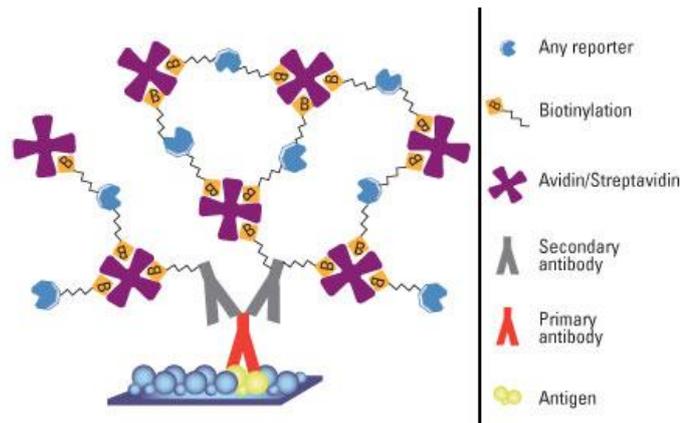


Figura X.

14. Aspirar y lavar cuidadosamente con 500 μL de PBS+1%BSA (la preparación se indica en Materiales), 3 veces.
15. Posteriormente se prepara una solución de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB). Este compuesto da lugar a un producto cromogénico de color marrón, que permite la visualización de las células infectadas. La enzima HRP cataliza la conversión de DAB en el producto coloreado. Esta solución se prepara inmediatamente antes de utilizarla. Añadir 250 μL de la solución DAB e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
16. Aspirar la solución DAB y añadir 500 μL de PBS.
17. Al microscopio contar un mínimo de 3 campos de las células con infección positiva (se aprecian de color marrón o negro). Utilizando el objetivo 20X del microscopio calcular el número promedio de células positivas en cada pocillo.
18. Calcular las unidades infectantes (IFU) / mL utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\left(\frac{\text{células infectadas}}{\text{campo}} \times \frac{\text{campos}}{\text{pocillos}} \right)}{\text{Volumen de virus (mL)} \times \text{Factor de dilución}}$$

Para determinar el área de los campos por pocillo se utiliza la siguiente tabla:

Tabla 11. Derivación del área contada en campos/ pocillo

Objetivos	Lentes oculares (10x)			Campos/pocillo		
	Ampliación total	Diámetro del campo	Área del campo	Placa de 12 pocillos	Placa de 24 pocillos	Placa de 96 pocillos
				Área=3,8cm ²	Área=2,0cm ²	Área=0,32cm ²
4X	40X	5 mm	19,6	19	10	1,6

5X	50X	4 mm	12,5	30	16	2,6
10X	100X	1,8 mm	2,54	150	79	12,6
20X	200X	0,9 mm	0,64	594	313	50

2.1.6. Generación e infección con Lentivirus

Los lentivirus pueden entregar grandes cantidades de información genética al ADN de las células huésped y pueden integrarse tanto en las células que se dividen como en las que no se dividen. El genoma viral se transmite a las células hijas durante la división, esto lo convierte en uno de los vectores de administración de genes más eficientes.

La mayoría de los vectores lentivíricos se basan en el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

En cuanto a la construcción del vector lentiviral, los lentivirus tienen altas tasas de mutación y recombinación, por lo que la probabilidad de que el VIH se origine y autoreplique durante la fabricación del vector por recombinación es un grave problema de seguridad. Para reducir esta probabilidad genes esenciales del virus son separados en diferentes plásmidos y los genes accesorios virales son eliminados. De esta manera múltiples eventos de recombinación son necesarios para reconstituir un lentivirus de replicación competente. Los componentes esenciales para generar un vector lentiviral incluyen:

- Un esqueleto lentiviral también conocido como plásmido vector de transferencia o constructo lentiviral.
- El transgen de interés como por ejemplo un cDNA, miRNA o shRNA. Normalmente, el transgen de interés se encuentra clonado en el esqueleto lentiviral, además este plásmido también contiene la secuencia de encapsulamiento del genoma viral Psi (Ψ) y las regiones terminales (5' y 3') denominadas LTR, que son las secuencias por donde se integra el lentivirus al genoma de la célula huésped.
- Plásmidos de ayuda para el empaquetamiento (psPAX2, pCMVDR7.8) y la envoltura (pMD2.G)

- Una línea celular de fabricación, en la cual se lleva a cabo la producción. Al igual que en los adenovirus, las células HEK 293 permiten la generación de las partículas lentivirales.

Dos días después de la transfección de células HEK 293T, el sobrenadante celular contiene vectores lentivirales recombinantes, que pueden usarse para transducir las células de interés. Una vez en las células diana, el ARN viral se transcribe inversamente, se importa al núcleo y se integra de forma estable en el genoma del huésped. Uno o dos días después de la integración del ARN viral, se puede detectar la expresión de la proteína recombinante.

En esta tesis se generó un modelo de células PINK1 shRNA en células HeLa mitoDsRed y otro modelo “knockdown” de TP53INP2 en células L6E9. En el caso del “knockdown” de PINK1 se utilizó el vector pLKO.1 que además de contener el shRNA para PINK1 confiere resistencia a Puomicina. Para la generación de las células “knockdown” de TP53INP2 se utilizó el vector pLVTHM que además expresa GFP.

A continuación se describe la metodología para la producción de los lentivirus y la posterior infección que fue empleada tanto para la generación del “knockdown” de PINK1 como para TP53INP2.

- Día 0. Sembrar células HEK293T, aproximadamente 1 500 000, en placas de 100 mm tratadas previamente con polilisina por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Día 1. Al día siguiente, cuando las células se encuentren al 70% de confluencia se realiza la transfección con PEI tal como se describió en 2.1.3. Mezclar el DNA y NaCl, agitar y luego añadir el PEI. Dejar la mezcla a temperatura ambiente por 20 minutos. Luego añadir la mezcla a cada placa. Incubar a 37°C. *Recomendación*, se puede poner un control positivo para saber si la transfección es adecuada, como por ejemplo GFP o RFP.
- Día 2. Aspirar el medio y añadir 10 mL de medio nuevo completo. Incubar la placa a 33°C para permitir la expresión lentiviral.

- Día 3. Recolectar el medio y centrifugar 10 minutos a 2500 rpm y 4°C. Recolectar el sobrenadante y filtrar utilizando filtro de 0,45 µm. Guardar a 4°C. Añadir 10 mL de medio nuevo a la placa y continuar con la expresión lentiviral a 33°C. Paralelamente se siembran las células que se infectará con los extractos lentivirales.

- Día 4. Recolectar el medio y centrifugar 10 minutos a 2500 rpm y 4°C. Recolectar el sobrenadante y filtrar utilizando filtro de 0,45 µm, mantener en hielo, descartar las placas de células HEK293. Los sobrenadantes filtrados los días 3 y 4 se utilizan para infectar las células sembradas el día anterior. Es recomendable que estas células se encuentren al 70% de confluencia. Para mejorar la eficiencia de la infección se añade Polybrene, la concentración de este polímero catiónico dependerá del tipo de célula con la cual se está trabajando.
Recomendación, más adelante, en el caso de usar pLKO se seleccionará las células con infección positiva utilizando Puromicina. Por lo tanto es importante determinar varios días antes cual es la concentración óptima de este antibiótico para la línea celular que estamos utilizando. Es aconsejable sembrar células en una placa de 6 pocillos y añadir concentraciones de Puromicina en el rango de 1-10 µg/mL. Se debe reemplazar el medio de estas células por medio fresco con Puromicina cada 2 a 3 días. La concentración mínima de Puromicina que cause muerte celular completa después de 3 a 5 días debe ser la concentración utilizada.

- Día 5. Al día siguiente remover el medio y añadir medio nuevo.

- Día 6. Remover y añadir medio nuevo con Puromicina utilizando la concentración efectiva determinada. En adelante, reemplazar con medio nuevo más Puromicina cada 2 o 3 días hasta que las colonias resistentes puedan ser identificadas. En el caso de las células que fueron infectadas con los lentivirus generados con pLVTHM, se añade medio fresco y se mantienen durante una semana, reponiendo medio fresco cada vez que sea necesario. Al cabo de ese tiempo se seleccionará las células infectadas que expresan GFP utilizando citometría de flujo. En esta tesis se utilizó el citómetro de flujo MoFlo y el software Summit 3.1 (Dako Cytomation).

2.2. Análisis de proteínas

2.2.1. Obtención de extractos totales

- Se aspira el medio de las placas con células, las cuales deben estar colocadas en un baño de hielo para mantener una temperatura aproximada de 4°C.
- Posteriormente se lava la placa con PBS frío (1x). Este procedimiento se realiza dos veces.
- En seguida se añade tampón RIPA, al cual se le añadió previamente inhibidores de proteasas y fosfatasas, el volumen añadido de tampón dependerá del tamaño de la placa y la confluencia de las células. El tampón RIPA contiene un detergente que permite la ruptura de la membrana celular y la salida de los componentes de la célula. Posteriormente con ayuda de una espátula, llamada scrapper, se remueven las células. Adicionalmente, para mejorar la lisis celular se resuspende el extracto varias veces utilizando una jeringuilla de tuberculina con una aguja calibre 26.
- Centrifugar a 15 000 xg y una temperatura de 4°C, durante 30 minutos.
- Colocar el sobrenadante en un tubo limpio y frío.

2.2.2. Cuantificación de proteínas

- Una vez obtenido los homogenizados se debe realizar la cuantificación de las proteínas, para ello se utiliza un kit comercial disponible en el laboratorio, Pierce™ BCA Protein assay.
- Se utiliza una placa de 96 pocillos, la primera columna se emplea para la curva de calibración utilizando un estándar de albúmina a una concentración de 0, 2, 4 y 8 µg respectivamente. En el resto de la placa se añade 1 µL de los homogenizados por triplicado.
- El kit contiene una solución A y una solución B, utilizando una mezcla de estas soluciones se prepara una solución de trabajo que se añadirá en cada pocillo de la placa. La proporción de la solución de trabajo es 10 mL de la solución A y 200 µL de la solución B. Posteriormente se añade 200 µL de la solución de trabajo y se incuba la placa a 37°C durante 30 min.
- Al terminar el tiempo de incubación se deja enfriar la placa y luego se lee en un espectrofotómetro a 572 nm.

- Finalmente, utilizando las lecturas de absorbancia de la curva de calibración se determina la concentración de los homogenizados.

2.2.3. Western Blot

La técnica de Western blot es un procedimiento que permite la identificación de una proteína a partir de una mezcla de proteínas de un extracto celular. El análisis de proteínas se realiza gracias a la separación de la mezcla según el peso molecular, a la transferencia de las proteínas a un soporte sólido como puede ser una membrana de nitrocelulosa o de PVDF y finalmente al empleo de anticuerpos primarios y secundarios que permiten la visualización de la proteína de interés.

2.2.3.1. Preparación de las muestras

Los extractos celulares que serán utilizados en esta técnica deben ser previamente desnaturalizados, por lo tanto para la preparación de las muestra se utiliza un tampón de carga conocido también como *Loading sample buffer*. Debido al detergente SDS presente en este tampón, las proteínas pierden su estructura nativa pero mantienen los enlaces disulfuro. Además, el tampón de carga contiene un colorante que permite seguir el progreso de la migración de las proteínas durante la electroforesis. Adicionalmente durante la preparación de la muestra se añade un compuesto llamado DTT que permite la ruptura de los puentes disulfuro.

La preparación se realiza de la siguiente manera: se toma un volumen equivalente a 50 µg de proteína, si es necesario también se añade agua, luego se añade el volumen necesario de LSB 4x y finalmente el DTT 2M, la concentración final de DTT en la muestra deberá ser de 100 mM. Una vez preparada la solución se calienta a 95°C durante 5 minutos.

2.2.3.2. Electroforesis

Durante la electroforesis se utilizan geles de poliacrilamida de distinta porosidad como soportes para la separación: un gel compactador y un gel separador. El primero es ligeramente ácido y permite la concentración de la muestra. El segundo tiene un pH básico y un mayor contenido de

poliacrilamida que le confiere la formación de poros más estrechos. Por lo tanto la separación de las proteínas ocurrirá debido al tamaño, es decir proteínas pequeñas viajarán fácilmente y serán rápidamente separadas. En la sección de materiales se detalla la preparación de los geles.

Las proteínas cargadas en el gel poseen una carga negativa por efecto de la desnaturalización por calor y viajan hacia el electrodo positivo cuando se aplica un voltaje. Las muestras y el estándar de proteínas son cargadas en los diferentes pocillos. Luego los geles son conectados a una fuente de energía. Es importante tener en cuenta el voltaje, debido a que un voltaje muy alto puede sobrecalentar y distorsionar las bandas.

2.2.3.3. Transferecia

Después de la separación de la muestra, esta se transfiere a una membrana. La transferencia se hace usando un campo eléctrico que se encuentra orientado hacia la superficie del gel, de tal manera que permite la migración de las proteínas cargadas negativamente del gel hacia la membrana. En este proceso, la membrana es la parte esencial. Tal como se señaló existen dos tipos de membrana, las de nitrocelulosa y las de PVDF. La primera se caracteriza por su alta afinidad a las proteínas y su capacidad de retención, sin embargo es muy frágil. En este sentido, las membranas de PVDF constituyen un mejor soporte y pueden ser reutilizadas siguiendo el proceso de *Stripping*.

Durante la transferencia se debe colocar la membrana entre la superficie del gel y el electrodo positivo, como en un sándwich. El sándwich incluye una esponja a cada lado y papel de filtro para proteger el gel y la membrana. Es importante indicar que la membrana debe haber sido previamente equilibrada con metanol 2 minutos, agua 2 minutos y tampón de transferencia por otros 2 minutos. Una vez listo el sándwich se coloca en la cubeta y se conecta a la fuente de energía a 200 mA. Se debe tener en cuenta evitar el calentamiento del tampón.

2.2.3.4. Bloqueo, lavado e incubación con anticuerpos

El bloqueo es un paso muy importante para evitar la unión de los anticuerpos a uniones inespecíficas de la membrana. Este proceso se

realiza utilizando una solución de leche descremada al 5% diluida en una solución de PBS-Tween.

Luego de realizar el bloqueo durante 30 minutos se incuba la membrana con el anticuerpo de interés. En este punto la concentración del anticuerpo utilizado dependerá de las instrucciones del fabricante. El anticuerpo se prepara utilizando la solución de PBS-Tween y se incuba la membrana durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realiza 3 lavados de 10 minutos cada uno. El lavado es un procedimiento muy importante porque permite minimizar el background y remover el anticuerpo unido inespecíficamente. Luego de esto se incuba la membrana con un anticuerpo secundario que se encuentra acoplado con una enzima HRP (*horseradish peroxidase*) durante una hora, al cabo de los cuales nuevamente se lava la membrana 3 veces durante 10 minutos.

Para la detección se utiliza un kit comercial en la proporción 1:1. Esta solución reacciona con la enzima HRP y se emite una señal luminiscente que es capturado en un film. Esta última etapa se desarrolla en una habitación oscura utilizando el revelador automático HyperProcessor® Model AM4, Amersham Pharmacia Biotech.

2.2.3.5. “Stripping”

Esta técnica permite la reutilización de la membrana, de tal manera que se pueda utilizar para la detección de otras proteínas. Para desnaturalizar los anticuerpos unidos a la membrana se utiliza la temperatura o también agentes reductores. Esto nos permitirá incubar la membrana nuevamente con otros anticuerpos.

Antes de comenzar el stripping se lava la membrana con la solución PBS-Tween, luego se incuba la membrana con agua caliente durante 10 minutos. Se repite el procedimiento y luego se continúa con el bloqueo utilizando la solución de leche al 5%, tal como el apartado anterior.

2.2.3.6. Cuantificación

Es importante tener en cuenta que la información obtenida a partir del western blot es semi-cuantitativa. Dado que provee una comparación de los niveles de proteínas pero no una medida absoluta de la cantidad.

Durante esta tesis se utilizó el programa Fiji (Schindelin et al., 2012) para la cuantificación de las bandas de las diferentes proteínas estudiadas.

2.2.4. Inmunoprecipitación

Las interacciones proteicas pueden ser determinadas a partir de una serie de métodos como: inmunoprecipitación, co-inmunoprecipitación, pull down, ensayo de doble híbrido en levadura, entre otros.

En el caso de esta tesis, para el estudio de las interacciones de la proteína TP53INP2 y Parkin se utilizó la inmunoprecipitación. Esta técnica es uno de los métodos más ampliamente utilizados para el aislamiento de proteínas y otras biomoléculas a partir de lisados celulares o de tejidos, con el propósito de una detección posterior por western blot o alguna otra técnica. La inmunoprecipitación es considerada una técnica de purificación de proteínas por afinidad a pequeña escala, gracias al uso de un anticuerpo específico que se encuentra inmovilizado en un soporte sólido, como pueden ser bolas magnéticas o resina de agarosa. Para esta tesis se utilizó un gel de agarosa comercial que ya tenía el anticuerpo monoclonal Flag unido covalentemente a la resina, ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel.

Días previos se sembraron las células y se realizaron las transfecciones según se describió en apartados anteriores, en algunos casos, 24 horas después de la transfección se incubó las células con el agente despolarizante CCCP durante 6 horas, luego se prosiguió tal como se describe a continuación:

2.2.4.1. Lisis celular

Se recogen las células a una confluencia entre el 70 y 90%. Se remueve el medio de crecimiento y posteriormente se lavan las células con PBS dos veces. Luego se guardan las placas en posición invertida a -80 °C para obtener un mejor lisado de las células. Al día siguiente, se descongelan las placas y se añade 1 mL de tampón de lisado, si las células están muy confluentes. La preparación del tampón del lisado se describe en la sección de materiales. A continuación se raspan las placas suavemente y se recolectan las células. Luego se centrifuga el lisado durante 10 minutos a 12000 xg y 4°C. Después el sobrenadante se transfiere a un tubo previamente enfriado. Es importante, mantener en hielo o guardar a -70°C

si no se va usar el lisado inmediatamente. En este punto conviene tomar una alícuota del 10% que será utilizado posteriormente para el western blot.

2.2.4.2. Preparación de la resina

1. Antes de coger el volumen de resina de agarosa necesario para el experimento es conveniente homogenizar bien la suspensión, luego se toman 40 μ L de la suspensión y se colocan en un tubo previamente enfriado.
2. Se procede a centrifugar la resina 30 segundos a 8000 xg y 4°C. Se deja reposar entre 1 y 2 minutos y luego se remueve el sobrenadante con mucho cuidado. Es recomendable utilizar una punta muy fina para evitar remover el lecho de la resina.
3. Se lava la resina 2 veces con un volumen de 500 μ L de tampón de lavado 1x. Centrifugar cada vez 30 segundos a 8000 xg y 4°C, dejar reposar 1 minuto y remover el sobrenadante. Es importante tener cuidado al quitar el sobrenadante puesto que se podría eliminar también la resina.

2.2.4.3. Inmunoprecipitación de las proteínas unidas a Flag

1. Se adiciona el lisado celular a la resina lavada.
2. Se colocan los tubos de las muestras y los controles en un agitador circular por 12 horas a 4°C. Se recomienda una agitación suave. En este punto se conseguirá la unión de la proteína de interés al anticuerpo unido a la resina. Este paso podría ser reducido a unas 2 horas. En el caso de esta tesis se utilizó un tiempo de incubación de 12 horas.
3. Seguidamente se centrifuga la resina por 30 segundos a 8000 xg y 4°C. Se recolecta el sobrenadante cuidadosamente y se toma una alícuota de este para utilizarlo posteriormente durante la detección por western blot.
4. Luego se lava la resina 3 veces con volúmenes de 500 μ L de tampón de lavado 1x. Entre lavado y lavado se realizan centrifugaciones de 30

segundos a 8000 xg y 4°C. Conviene dejar reposar 1 minuto antes de remover el sobrenadante.

2.2.4.4. Elución con el péptido Flag 3x

1. Se prepara el tampón de elución utilizando una solución stock 5 mg/mL de Flag 3x diluyendo 3 µL del stock en 97 µL del tampón de lavado 1x, obteniendo una concentración final de 150 ng/mL.
2. Añadir el tampón de elución a la resina lavada, el volumen a añadir dependerá de si se desea obtener una muestra concentrada. Es recomendable añadir entre 40 y 60 µL de tampón de elución.
3. Posteriormente se incuban las muestras con la resina en un agitador circular durante 30 minutos a 4°C, agitación suave.
4. Al cabo del tiempo señalado se centrifugan los tubos 30 segundos a 8000 xg y 4°C. Se deja reposar 1 minuto y se recolecta el sobrenadante cuidadosamente. Este sobrenadante se utiliza posteriormente en el ensayo de western blot.

2.3. Técnicas de DNA

En el desarrollo de esta tesis se aplicaron distintas técnicas de manipulación del DNA. Todos los procedimientos y técnicas de trabajo con DNA y bacterias requirieron la utilización de material estéril para evitar posibles contaminaciones con DNAsas, otras bacterias, DNAs extraños o RNAsas, según fuera el caso. Conviene señalar también que las soluciones utilizadas se prepararon con agua ultrapura obtenida a partir del sistema MilliQ de Millipore, cuando no se especifica lo contrario. Respecto a la manipulación de bacterias, esto se realizó a lado de un mechero Bunsen puesto que esta herramienta proporciona un área de trabajo estéril.

2.3.1. Transformación

La transformación consiste en la incorporación de material genético en las bacterias. Este material genético es un DNA circular conocido como plásmido, el cual contiene DNA de interés incluido en la secuencia de un gen que garantiza la selección de las bacterias que incorporan el plásmido. Por lo general, estos genes proporcionan

resistencia a antibióticos como la ampicilina y la kanamicina. El método utilizado durante esta tesis fue la transformación por choque térmico.

- **Día 1.** Para mantener y amplificar plásmidos, éstos se transforman en las cepas de *E. coli* XL1- Blue desarrolladas por *Stratagene*. Estas bacterias se denominan competentes porque fueron sometidas a un proceso de sensibilización a la transformación.
 - Es conveniente empezar por la tarde haciendo una dilución de los stock de plásmidos 1/10 H₂OmilliQ o el equivalente a 50 ng.
 - Retirar las células XL1-Blue a -80°C y colocarlas en nuevos tubos Eppendorf fríos y rotulados. En esta etapa es importante utilizar el mechero. Seguidamente añadir 1 µL de las diluciones de los plásmidos.
 - Seguidamente, se dejan los tubos en hielo durante 30 minutos, luego se realiza el choque térmico incubando la solución a 42°C durante 90 segundos, después nuevamente 2 minutos en baño de hielo. Al cabo de este tiempo se añade 1 mL de medio LB. Usar el mechero. Después se colocan los tubos Eppendorf en agitación a 700 rpm y 37°C, durante 45 minutos.
 - Al terminar el tiempo de incubación se realiza la siembra en placas con antibiótico, esto permitirá que solo crezcan las bacterias que hayan incorporado el DNA del plásmido exógeno. Es recomendable utilizar dos volúmenes de la mezcla, 50 y 100 µL, para realizar la siembra. Asimismo es importante hacer una distribución homogénea por toda la superficie de la placa. Es aconsejable utilizar el mechero. Finalmente se debe incubar la placa de LB agarosa en posición invertida a 37°C durante toda la noche.

- **Día 2.** Se recomienda empezar por la mañana. Antes de empezar con el procedimiento es importante observar todas las placas, en la placa control no se debe observar ningún crecimiento. Es importante seleccionar las colonias aisladas y bien definidas.
 - Añadir al medio LB el antibiótico. Tomar 3 mL de esta solución y colocarlo en un tubo de siembra, picar una colonia aislada y depositar la punta en el interior del tubo. Incubar el tubo a 37°C durante 8 horas. Es aconsejable utilizar controles negativos.

2.3.2. Purificación de ADN

Para purificar los plásmidos a partir de los cultivos bacterianos se utilizan *kits* comerciales en función de la cantidad y de la calidad del DNA que se necesita. En el caso concreto de los experimentos llevados a cabo en esta tesis se necesitaban plásmidos con una concentración alta, del orden de 2 a 4 mg. Para conseguir este orden se utilizó el kit (Qiagen, #12163 y #12191, respectivamente). A continuación describo el procedimiento inmediatamente posterior a la transformación, el día 2:

- Al cabo de las 8 horas de incubación, se añade nuevamente antibiótico a un matraz con 200 mL de medio LB. Se selecciona el tubo con mayor turbidez, en el caso de haber realizado duplicados, y se incorpora el contenido del tubo en el matraz.
- Finalmente se colocan los matraces en una incubadora a 37°C, 250 rpm hasta el día siguiente en que se realizará la purificación del ADN.
- Al día siguiente el personal técnico del laboratorio se encarga de la purificación utilizando el kit que se ha señalado.

2.3.3. Extracción de RNA

La purificación del RNA es un paso crítico para un amplio número de técnicas analíticas como por ejemplo: la síntesis de cDNA, la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR), la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), etc. Por lo tanto la obtención de RNA puede ser considerado como un procedimiento común sin embargo es necesario tomar muchas precauciones para evitar la contaminación y degradación del RNA por parte de la RNasa. Antes de empezar la extracción es conveniente limpiar el área de trabajo con productos como RNase Zap o agua DPEC, asimismo se recomienda utilizar puntas y tubos libres de RNasas. La clave para extraer RNA intacto es una homogeneización rápida y completa de la muestra en un tampón de lisis que contiene guanidina y 2-mercaptoetanol, esto debido a que las sales caotrópicas como la guanidina inhiben temporalmente la actividad de la RNasa pero el 2-mercaptoetanol inhibe irreversiblemente a la enzima. En algunas ocasiones se utiliza DTT en lugar del 2-mercaptoetanol, pero este compuesto no es tan efectivo como inhibidor irreversible de la RNasa. A día de hoy en el laboratorio se usa un kit comercial para la extracción del RNA, este kit proporciona columnas de centrifugación que contienen una resina de

sílice, que se une selectivamente al RNA, dependiendo de las condiciones salinas (cloruro de guanidina, tiocianato de guanidina, urea y perclorato de litio, todos ellos agentes caotrópicos) y de otros factores influenciados por el método de extracción. Además, para aumentar e influir en la unión del RNA a la sílice, se añade también alcohol. Posteriormente se realizan tres lavados, el primero para eliminar impurezas como proteínas y el segundo y el tercero para eliminar las sales.

A continuación se describe el protocolo utilizado para la extracción del RNA:

1. Preparar la cantidad necesaria de tampón de lisado (proveído por el kit) conteniendo 2-mercaptoetanol al 1% (10 μ L de 2-mercaptoetanol por cada mL de tampón de lisado).
2. Remover el medio de crecimiento y realizar un lavado con PBS.
3. Utilizando puntas estériles y libres de RNasa añadir 700 μ L del tampón de lisado y 2 mercaptoetanol al 1% (a una placa de 100 mm). Pasar el lisado a través de una jeringa con aguja 25 x 16mm entre 5 y 10 veces.
4. Preparar una solución de etanol al 70%, añadir un volumen (700 μ L) de esta solución al homogenado.
5. Con ayuda del vortex, mezclar bien y dispersar cualquier precipitado visible que pudiera haberse formado después de la adición de la solución etanólica.
6. Transferir 700 μ L de la mezcla anterior, incluyendo cualquier precipitado, a la columna con el tubo colector.
7. Centrifugar a 12000 \times g por 15 segundos. Descartar la solución eluida recogida en el tubo colector, reinsertar la columna en el mismo tubo colector y transferir 700 μ L más de la mezcla anterior (punto 5). Repetir este procedimiento hasta que toda la mezcla haya sido procesada.
8. Si es necesario obtener RNA libre de DNA se realiza el siguiente tratamiento para la remoción del DNA:
 - a. Se utiliza 80 μ L de una solución de DNasa. Para preparar esta solución se utilizan los reactivos proporcionados por un kit comercial. La solución se prepara en un tubo libre de RNasas de la siguiente manera:
 - 8 μ L de 10X DNase I Reaction Buffer
 - 10 μ L de la DNasa resuspendida (\sim 3U/ μ L)
 - 62 μ L del H₂O libre de RNasas

- b. Añadir 350 μL de **tampón de lavado I** a la columna, centrifugar a 12000 xg durante 15 segundos. Descartar la solución eluida y el tubo recolector. Colocar la columna en un nuevo tubo colector, añadir 80 μL de la solución de DNasa en la superficie de la sílice, incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, añadir nuevamente 350 μL de **tampón de lavado I**, centrifugar a 12000 xg durante 15 segundos, descartar la solución eluida, insertar la columna en un nuevo tubo colector. Proseguir con el punto 9.
9. Añadir 700 μL del **tampón de lavado I** (proveído por el kit) a la columna. Centrifugar a 12000 xg durante 15 segundos. Descartar la solución eluida y el tubo colector. Colocar la columna en un nuevo tubo colector.
10. Añadir 500 μL del **tampón de lavado II** (este tampón contiene etanol y también es proveído por el kit) a la columna. Centrifugar a 12000 xg durante 15 segundos. Descartar la solución eluida y reinsertar la columna en el tubo colector.
11. Repetir el paso 10.
12. Centrifugar a 12000 xg durante 2 minutos para secar la membrana unida al RNA. Descartar el tubo colector e insertar la columna en un nuevo tubo libre de RNasas.
13. Adicionar 50 μL de agua libre de RNasas en el centro de la columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
14. Centrifugar la columna a 12000 xg durante 2 minutos para eluir el RNA. En este punto se puede guardar el RNA obtenido a -80°C o se puede evaluar la calidad del RNA.
15. Para evaluar la calidad del RNA obtenido se determina su absorbancia, la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm es utilizada para asegurar la pureza del DNA y el RNA. Una proporción de aproximadamente 1,8 es aceptado como "puro" para el DNA y una proporción de aproximadamente 2,0 es generalmente aceptado como puro para el RNA. Si la proporción es apreciablemente más baja en cada caso esto puede indicar la presencia de proteína, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente cerca de 280 nm.
16. Adicionalmente para evaluar la integridad del RNA se recomienda revisar la calidad de las bandas de RNA ribosómico 28S y 18S en un gel de agarosa. Una

proporción de 2:1 de la intensidad de las bandas 28S y 18S es indicativo de RNA intacto.

2.3.4. Transcripción inversa

La transcripción inversa es una técnica que permite sintetizar DNA complementario (cDNA) de moléculas de RNA usando para ello la enzima transcriptasa reversa.

- Utilizando el RNA obtenido en la sección anterior (2.3.3) se prepara una solución de 10 mL y 2 µg de RNA, se recomienda utilizar H₂O libre de RNAsas y también preparar un control negativo que únicamente contenga H₂O.
- A la solución anterior se añade 1 µL de OligodT.
- Incubar 5 minutos a 70°C.
- Preparar una solución

- 4 µL Tampón 5x
- 2µL DTT 0,1M
- 1µL RNase out
- 1 µL dNTPs (Solución 10mM, 1:1:1:1 de dATP, dCTP, dGTP, DTTP)



Hacer una mezcla con la cantidad total de muestras +2

- Retirar los tubos incubados a 70°C y colocarlos en hielo durante 1 minuto. Mientras tanto, añadir 8 µL de la solución anterior.
- Inmediatamente después colocar los tubos 2 minutos a 42°C. Luego añadir 1 µL de Superscript II (manteniendo los tubos a 42°C). Continuar con la incubación durante 50 minutos a 42°C sin agitar.
- Posteriormente se incuba 5 minutos a 70°C para desnaturalizar la retrotranscriptasa (Superscript II).
- Retirar los tubos y añadir 80 µL de agua libre de RNAsas a cada muestra (para conseguir una dilución óptima para la RT-PCR).
- Guardar a -20°C hasta su uso.

2.3.5. Extracción de ADN

Al igual que para la extracción de RNA, en la extracción de ADN se utiliza un kit comercial. Es importante comentar además que el principio de extracción es más o menos similar al del RNA. Así por ejemplo, las columnas utilizadas para la extracción de ADN también contienen sílice porque se unen selectivamente a los ácidos nucleicos como el ADN, esto claro dependiendo de las condiciones salinas del tampón de lisis. Del mismo modo, la composición del tampón de lisis para la extracción de ADN contiene una alta concentración de sales caotrópicas que permiten la desestabilización de los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas, y por ende la desnaturalización de las proteínas y nucleasas. Las sales caotrópicas son críticas para la lisis, pero también para la unión del ADN (o ARN) a la columna. Adicionalmente, para aumentar e influir en la unión de los ácidos nucleicos a la sílice, se añade alcohol. Posteriormente se realizan lavados sucesivos para eliminar las impurezas y las sales. El último paso del protocolo de extracción es la elución. En este caso, a diferencia de la elución en la purificación de RNA, se emplea un tampón de pH ligeramente básico entre 8 y 9.

1. Lavar la placa con PBS 2 veces.
2. Añadir 500 μ L de PBS y separar las células de la placa suavemente con ayuda de una espátula. Colocar la suspensión en un tubo y centrifugar a 300 x g durante 5 minutos.
3. Resuspender las células en 200 μ L de PBS y añadir 20 μ L de proteinasa K.
4. Añadir 200 μ L de **tampón AL** (proveído por el kit). Mezclar con ayuda de un vórtex. Incubar a 56°C durante 10 minutos.
5. Añadir 200 μ L de etanol (96 -100%). Mezclar con ayuda de un vórtex.
6. Transferir la solución a una mini columna de centrifuga. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Descartar la solución eluida y el tubo colector.
7. Colocar la columna en un nuevo tubo colector. Añadir 500 μ L de **tampón AW1**. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Descartar la solución eluida y el tubo colector.
8. Colocar la columna en un nuevo tubo colector. Añadir 500 μ L de **tampón AW2**. Centrifugar a 20 000 x g (14 000 rpm) durante 3 minutos. Descartar la solución eluida y el tubo colector.
9. Remover la columna cuidadosamente y colocarlo en un tubo recolector. Es importante evitar que la columna entre en contacto con la solución eluida del

punto 8. Añadir 100 μ L de **tampón AE**. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 6 000 x g durante 1 minuto.

2.3.6. PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA, durante varios ciclos repetidos, gracias a la reacción catalizada por la enzima polimerasa.

Si en la reacción se usa como sustrato DNA genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos DNA complementario proveniente del RNA mensajero se le denomina PCR en tiempo real (RT-PCR del inglés Reverse Transcription-PCR). Por lo tanto, la PCR en tiempo real es una variante de la PCR, pero es considerada una técnica cuantitativa.

Los elementos necesarios para la reacción son el *template* de DNA o cDNA, una enzima polimerasa termoestable, un par de oligonucleótidos o primers, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o tampón y H₂O. Generalmente la enzima, los dNTP's, el Mg⁺, el tampón y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se adquieren juntos en una solución conocida como "Master mix". Asimismo, los primers utilizados deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen unos productos o amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente. Para evitar estos problemas, una alternativa es diseñar los primers, utilizando programas informáticos disponibles, o comprarlos ya validados. Todos estos elementos interactúan en las tres etapas principales de la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión.

Para la monitorización de los productos amplificados conforme se lleva a cabo la reacción se utilizan sistemas reporteros fluorescentes que se clasifican como específicos y no específicos. En el caso de los no específicos, éstos implican el uso de moléculas intercalantes con afinidad por el DNA de doble cadena que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de DNA de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado de estas características es una molécula cargada positivamente que se conoce como SYBR Green. Una desventaja

de este reportero es que puede unirse a cualquier molécula de DNA de doble cadena, esto incluye dímeros de primers. Para evitar este problema el software de los equipos utilizados realizan una curva de disociación que permite evaluar si se formó un solo producto o si hay presencia de dímeros.

Los reporteros específicos siguen el principio conocido como transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) para generar la señal. Este tipo de sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la enzima polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser excitada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. Este método es muy seguro, puesto que mientras no hay unión de la sonda a su blanco, no hay amplificación y tampoco señal fluorescente; es por eso que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de este sistema son las sondas comerciales conocidas como TaqMan®.

2.3.7. Generación de una forma corta de Parkin (Δ UBL Parkin)

Para generar una forma wild type y otra forma corta de Parkin, Δ UBL Parkin, se utilizó el sistema de clonación Gateway. Esta tecnología permite transferir fragmentos de ADN entre plásmidos utilizando dos secuencias de recombinación y dos mezclas enzimáticas a través de dos reacciones denominadas: recombinación BP y recombinación LR. La reacción BP es catalizada por la mezcla enzimática BP clonasa, que recombina los sitios *att* B, de un fragmento de DNA, con sitios *att* P presentes en el vector pDONR 221, de uso exclusivo para el sistema de clonación Gateway. En esta primera recombinación se obtiene un plásmido denominado "Entry clon". La segunda recombinación catalizada por la mezcla LR clonasa, produce la transferencia del inserto del "entry clon" flanqueado por sitios *att* L a cualquier "destination vector" que contenga los sitios *att* R.

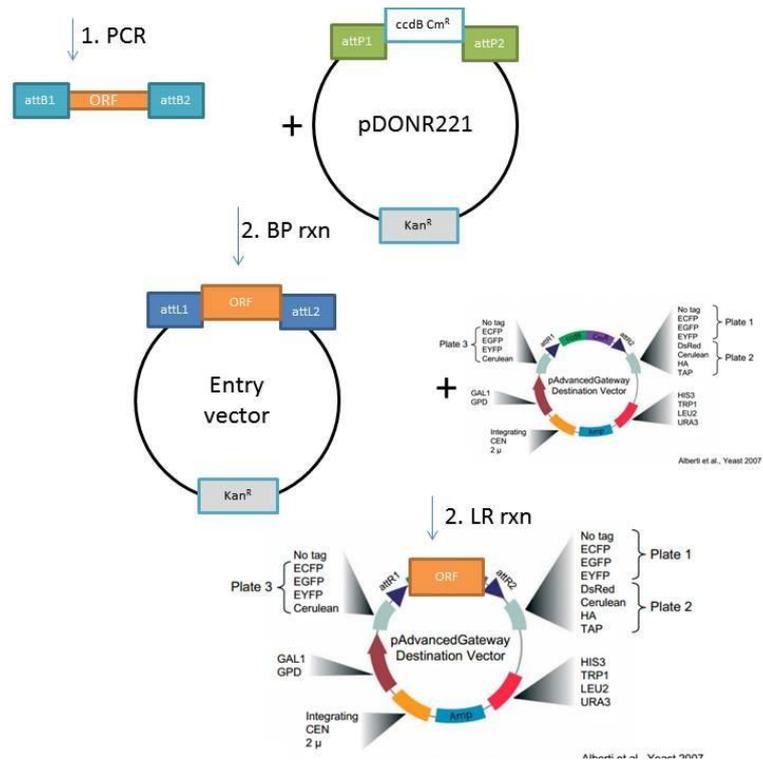


Figura X.

Procedimiento:

1. El primer paso del sistema de clonación Gateway es el diseño de los primers, estos deben presentar las secuencias responsables de la recombinación.
 - Forward: 4 residuos de Guanina en el extremo 5' seguido por 25 pares de bases correspondientes al sitio attB1 seguido por al menos 18-25 pares de bases de la secuencia específica del gen

Wt Parkin

5'- GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TTC-ACC-ATG-
 Sitio attB1
 GAC-TAC-AAG-GAC-GAC-GAT-GAC-AAG
 Flag
 - ATAGTGTGTTGTCAGGTTCAAC-3
 Parkin

ΔUBL Parkin

5'-GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TTC-ACC-ATG-
 Sitio attB1
 GAC-TAC-AAG-GAC-GAC-GAT-GAC-AAG-
 Flag
 GGTCAAGAAATGAATGCAACT-3

Δ UBL Parkin

- Reverse: 4 residuos de Guanina en el extremo 5' seguido por 25 pares de bases correspondientes al sitio attB2 seguido por al menos 18-25 pares de bases de la secuencia específica del gen

Parkin (wt y Δ UBL)

5'-GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTT-CTA-
Sitio attB2
CACGTCGAACCAAGTGGTCCCC-3
Stop Parkin

2. Una vez diseñados los primers, se realiza una PCR para generar el inserto inicial.
Dos PCR (una para Wt y otra para Delta UBL) utilizando como *template* prk5-Myc Parkin.

0,4 μ L de Myc Parkin (aproximadamente 0,13 μ g/ μ L)

5,0 μ L de 10 x Standard reaction buffer con MgCl₂ (Biotools®)

8,0 μ L de dNTPs (1,25 μ M de cada uno)

2,5 μ L del primer Fw

2,5 μ L del primer Rv

31, 1 μ L de H₂O milliQ

0,5 μ L de polimerasa 1U/ μ L (Biotools®)

Volumen final =50 μ L

Tabla 12.

Pasos del ciclo	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94°C	3 -10 min
Desnaturalización	25-35	94°C	5 - 60 s
Hibridación		T _m - 5°C	30 - 60 s
Extensión		72°C	60 s / 1kb
Extensión final	1	72°C	5 -15 min
Enfriamiento	∞	4°C	∞

3. Posteriormente se aísla el DNA inserto a través de una electroforesis preparativa y se mezcla con el vector denominado pDONR™ 221 y la BP clonasa. En este punto se desarrollará el “entry clon”.

Reacción BP

1 µL 150 ng de pDNOR 221
150 ng de los plásmidos de la PCR
H₂O milli Q
2 µL BP clonase

Volumen final 10 µL

25°C, 700 rpm, 2 horas

Al cabo de las 2 h se añade 1 µL de proteinasa K con el fin de inactivar la BP clonase, durante 10 minutos a 37°C.

4. El siguiente paso es transformar en E. coli y seleccionar las colonias con los plásmidos entry.

Transformar por choque térmico 1 a 2 µL de esta solución en células XL1-Blue, placa de agar y Kanamicina. El resto de la solución se guarda a -20°C.

Purificar por minipreps (se utiliza un Kit)

Secuenciar los productos de la miniprep

3 µL DNA (miniprep)
2 µL buffer Big Dye 3.1
1 µL primer (Mix Fw y Rv) M13 10 µM
3 µL H₂O milli Q

Volumen final 10 µL

5. Mezclar los plásmidos entry con el “destination vector” y la Clonase LR.

Reacción LR

150 ng del DNA purificado por miniprep (paso 9)
0,8 µL 150 ng de plásmido (pcDNA3)
H₂O milli Q
2 µL LR clonase

Volumen final 10 µL

25°C, 2 horas

Al cabo de las 2 h se añade 1 µL de proteinasa K con el fin de inactivar la BP clonase, durante 10 minutos a 37°C.

6. Transformar y seleccionar con el antibiótico adecuado. Se obtendrán las construcciones de interés.

- Transformar por choque térmico 1 a 2 μL de esta solución en células Top 10, placa de agar y Ampicilina. El resto de la solución se guarda a -20°C .
- Purificar por minipreps (se utiliza un Kit)
- Secuenciar los productos de la miniprep.
- Transformar por choque térmico y purificar por maxipreps.

2.3.8. Generación de mutantes de Parkin (wt C431A y $\Delta\text{UBL C431A}$)

La mutagénesis dirigida es una técnica que permite realizar mutaciones puntuales en la cadena del DNA. En esta tesis, la mutagénesis se realizó utilizando un kit comercial.

1. Preparar la siguiente solución

- 0,4 μL del plásmido a mutar
- 5,0 μL Tampón 10x (proveído por el kit)
- 1,0 μL de dNTPs
- 1,2 μL primer FW 10 μM (diseñado)
- 1,2 μL primer RV 10 μM (diseñado)
- 10 μL DMSO
- 1,0 μL Pfu Turbo DNA polimerase

2. Amplificar

Tabla 13.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	30 segundos
2	12-18	95°C	30 segundos
		55°C	1 minuto
		68°C	1 minuto /kb

3. Aproximadamente 2 horas después se añade 1 μL de la enzima de restricción Dpn I, que sólo reconoce la banda de ADN parental (metilada y no mutada).

4. Transformar en células XL1-Blue, purificar (minipreps) y secuenciar.

2.4. Técnicas de microscopia

Con el propósito de estudiar la localización, estructura y distribución de diferentes proteínas o estructuras en condiciones basales y en respuesta a ciertos compuestos se utilizó la microscopía confocal. Asimismo, para la detección se utilizó la técnica de inmunomarcación conocida como inmunofluorescencia.

2.4.1. Protocolo de inmunofluorescencia

- Las células para esta técnica deben haber sido sembradas previamente en cubreobjetos de 12 mm ó 24 mm. Una vez que se tienen las células listas para fijarlas se puede utilizar paraformaldehído o metanol, en el caso del primero se deberá posteriormente permeabilizar las células pero si se usa metanol (-20°C) las células ya se encontraran fijadas y permeabilizadas. En el desarrollo de esta tesis se usó paraformaldehído puesto que ensayos preliminares mostraron que la estructura de las mitocondrias se observaban dañadas con el uso de metanol.
- Antes de fijar las células se realiza un lavado con PBS 1x, posteriormente se añade paraformaldehído 4% a temperatura ambiente durante 15 minutos, la cantidad suficiente para cubrir totalmente los cubreobjetos.
- Seguidamente se realizan dos lavados con PBS durante 8 minutos. Luego se añade nuevamente PBS, en esta etapa se puede guardar la placa con los cubreobjetos a 4°C hasta el día siguiente o proseguir.
- Antes de seguir con esta etapa se debe preparar la solución de permeabilización que también se utilizará para bloquear uniones inespecíficas puesto que además del detergente contiene FBS. Esta solución de Tritón® X-100 se tiene que preparar a una concentración del 0.1% diluido en una solución de FBS al 3% (observar la preparación en el apartado de materiales). Se incuban los cubreobjetos durante 40 minutos con la solución preparada.

- Durante la incubación del cubreobjetos se puede preparar la solución del anticuerpo primario. La concentración utilizada dependerá de las recomendaciones encontradas en la hoja de información del anticuerpo. El anticuerpo se diluye en la solución de FBS al 3% y se centrifuga durante 30 segundos a 4°C para eliminar posibles agregados. En todo momento el anticuerpo se debe mantener frío, aproximadamente 4°C. Seguidamente se extiende una lámina de parafilm donde se distribuyen gotas del anticuerpo y sobre estas se colocan los cubreobjetos. Para mantener la humedad del ambiente se coloca papel húmedo alrededor de la lámina de parafilm, luego se cubre todo protegiéndolo de la luz y se deja incubar durante una hora a temperatura ambiente.
- Una vez culminado el tiempo de incubación se colocan los cubreobjetos en una placa y se lava con PBS 1x durante 10 minutos.
- Posteriormente se añade el anticuerpo secundario, preparado de la misma forma que el primario. Se procede nuevamente igual que en el paso de la incubación con el anticuerpo primario, se extiende una lámina de parafilm, se distribuye el anticuerpo, se colocan los cubreobjetos sobre el anticuerpo, se protege de la luz y se permite incubar durante 45 minutos.
- Luego se regresan los cubreobjetos a la placa anterior y se lavan 3 veces con PBS 5x durante 5 minutos.
- En el caso sea necesario utilizar un colorante para marcar los núcleos, se incuban los cubreobjetos con una solución de Hoechst (ver preparación en materiales) durante 10 minutos.
- Se lavan los cubreobjetos con PBS 1x durante 5 minutos. Luego se remueven los cubreobjetos, se enjuagan con agua milliQ y se colocan sobre un portaobjeto de cristal al cual previamente se le ha colocado unas gotas de Fluoromont®.

- Al día siguiente se observan los portaobjetos en el microscopio confocal.

2.4.2. Microscopia confocal

La microscopia de inmunofluorescencia fue desarrollada en el microscopio confocal de barrido Leica TCS SP2 (Leica Lasertechnik GmbH, Mannheim, Germany), adaptado a un microscopio invertido LEICA DM IRE2 para la adquisición secuencial de múltiples tinciones celulares. Las muestras se escanearon utilizando un objetivo de 63x1.40NA (aceite) y un zoom que oscilaba entre 1 y 1,5 para analizar las regiones intracelulares usando el software LCS de LEICA. Asimismo, para evitar efectos de interferencia de diferentes emisiones de fluorescencia en experimentos de tinción doble o triple, cada tinción se escaneó independientemente. Por otra parte, haciendo adquisiciones separadas, y excitando en una longitud de onda (verde 488nm) y adquiriendo imágenes en el más alto (rojo 561nm), se demostró que el canal verde no emite en el canal rojo. El formato de proyección adquirido fue de 1024 x1024, además las imágenes fueron adquiridas a partir de 10 a 20 secciones ópticas. Las figuras fueron procesadas a partir de archivos LEI utilizando el software libre FIJI (just ImageJ) (Schindelin et al., 2012).

El análisis de co-localización se realizó utilizando el plugin ICA (del inglés Intensity correlation analysis) desarrollado para ImageJ por Tony Collins, McMaster University, Ontario, (Li et al., 2004). Este plugin genera diferentes coeficientes de correlación como el de Pearson que va de 1 a -1. Un valor de 1 representa una co-localización perfecta (las imágenes son las mismas), cero significa que no hay correlación (aleatoria) y -1 significa anti correlación completa (no hay rojo cuando hay verde). Otro de los coeficientes que se pueden obtener es el coeficiente de superposición de Mander, este se sitúa entre 1 y cero, siendo 1 la co-localization alta, y cero la baja. Además este plugin genera una imagen PDM. PDM es el producto de las diferencias de las medias:

$$\text{PDM} = (\text{intensidad roja} - \text{intensidad media roja}) * (\text{intensidad verde} - \text{intensidad media verde})$$

Este parámetro se calcula y normaliza para cada píxel de una imagen. PDM expresa el grado de co-localización de dos señales con un valor que varía de -1 a +1 (igual al coeficiente de Pearson). En las imágenes, los pixels no colocalizadores (valores

negativos de PDM) se representan con un gradiente de intensidad azul, mientras que los valores de colocación se muestran con un gradiente de color amarillo.

2.5. Análisis de la función mitocondrial

2.5.1. Tinción con Mitotracker Deep Red

El número, estructura y las funciones de las mitocondrias difieren en las células animales y tejidos en relación a las necesidades energéticas. Debido a que las demandas de energía de las células pueden variar durante el desarrollo, la diferenciación, así como también en respuesta a al entorno y a alteraciones fisiológicas, el número de mitocondrias puede cambiar debido a procesos complejos y regulados.

El estudio de la compleja estructura y función de las mitocondrias in vivo es posible gracias a técnicas de marcaje fluorescente como son las sondas MitoTracker™ s. Estas herramientas útiles permiten la determinación in vivo de la masa, así como también la actividad oxidativa de las mitocondrias.

A continuación se describe el protocolo seguido para medir la masa mitocondrial:

1. Preparar una solución 10 μ M de MitoTracker™ Deep Red FM. Observación, se utiliza DMSO para hacer la dilución. Seguidamente, diluir la solución anterior utilizando medio fresco a 37°C para alcanzar una concentración de 10 nM de MitoTracker® Deep Red FM. Es importante tener un control negativo, es decir células no incubadas con Mitotracker.
2. Lavar las células con PBS 1x.
3. Incubar las células con la solución 10 nM de MitoTracker® Deep Red FM 15 minutos a 37°C.
4. Aspirar, lavar y tripsinizar, luego neutralizar la tripsina con medio fresco, recoger la suspensión celular en tubos de citómetro.
5. Posteriormente con ayuda del personal de servicio de citometría del Parc Cientific se realizan las mediciones en el citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter).

2.5.2. Análisis del potencial de membrana mitocondrial utilizando TMRM

En la mayoría de las células eucariotas una gran parte de la producción de ATP ocurre a través de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Debido a la oxidación de azúcares como la glucosa y los ácidos grasos libres se produce un bombeo de protones a través de la membrana interna mitocondrial, esto da lugar a la formación de un gradiente electroquímico o potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m). Posteriormente, este gradiente es utilizada por el complejo V para generar ATP. Por lo tanto el potencial de membrana mitocondrial constituye una parte importante del estado bioenergético de la célula y puede cambiar dependiendo de las necesidades energéticas de la célula. Es por ello que la medida del potencial de membrana mitocondrial puede proporcionar información valiosa sobre el estado y la función de las mitocondrias, en particular de la función general de la cadena respiratoria y el potencial de las mitocondrias para generar ATP.

El potencial de la membrana mitocondrial suele medirse utilizando colorantes catiónicos. Estos colorantes se secuestran en la matriz mitocondrial en cantidades directamente proporcionales al potencial de la membrana y pueden medirse usando técnicas fluorescentes estándar como la citometría de flujo. En el caso de esta tesis, se utilizó el éster metílico tetrametilrodamina (TMRM). Este colorante catiónico ingresa a la célula a través de la membrana plasmática y posteriormente es reclutado a la matriz mitocondrial, que es la parte la célula con más carga negativa. Sin embargo cambios en el potencial de membrana plasmática pueden influir en su localización, por lo tanto es conveniente utilizar un compuesto desacoplante como el CCCP para determinar correctamente el potencial de la membrana mitocondrial.

En seguida se describe el protocolo utilizado:

1. Es recomendable que las células se cultiven en placas de 12 pocillos. También es conveniente tener un control negativo sin sonda. Para determinar la concentración de CCCP óptimo es necesario hacer una curva dosis respuesta, en este caso se usaron concentraciones de CCCP de 5, 10, 20, 30 y 50 μM . Posteriormente se determinó que a 50 μM se alcanza la meseta de la curva.
2. Preparar una solución de CCCP 50 μM utilizando medio fresco a 37°C.
3. Lavar las células con PBS 1x.
4. Incubar las células con la solución de CCCP 50 μM a 37°C durante 15 minutos.

5. Preparar una solución de TMRM 200 nM en medio fresco, seguidamente preparar una solución de CCCP 50 μ M utilizando la solución de TMRM.
6. Añadir la solución anterior a cada pocillo y dejar incubar 20 minutos a 37°C.
7. Aspirar, lavar y tripsinizar, luego detener la tripsinización con medio fresco, recoger toda la suspensión en tubos de citómetro. Posteriormente con ayuda del personal de servicio de citometría del Parc Cientific realizar las mediciones en el citómetro Gallios (Beckman Coulter). Parámetros para el citómetro. FSH 60, SSC187 PE o FL-2 455, 5000-10000 eventos. Histograma: FL-2 /fluorescencia

2.5.3. Determinación de la oxidación mitocondrial utilizando MitoSOX™

Las mitocondrias son consideradas como la principal fuente de especies reactivas de oxígeno. La baja concentración de ROS generado desempeña funciones fisiológicas, sin embargo la sobreproducción de ROS puede dar lugar a un estado intracelular de estrés oxidativo, que puede a su vez causar daño celular permanente.

Para determinar la producción de ROS mitocondrial existen diferentes sondas fluorogénicas con afinidad por la mitocondria, como el MitoSOX. Gracias a su carga positiva, esta sonda se localiza rápidamente en la mitocondria. Una vez allí es oxidada por el superóxido mitocondrial y da lugar a un compuesto que se excita y emite a 510 y 580 nm, respectivamente.

El protocolo utilizado es el siguiente:

- Se recomienda sembrar las células en placas de 12 o 24 pocillos. Utilizar un control negativo sin sonda. Para incrementar la producción de superóxido mitocondrial utilizar como controles positivos Antimicina o Rotenona. En esta tesis obtuvimos mejores resultados utilizando Antimicina. La concentración óptima se determinó luego de tratar las células con diferentes concentraciones de esta droga.
- Preparar una solución de Antimicina 50 μ M utilizando medio fresco a 37°C.
- Incubar las células con Antimicina 50 μ M a 37°C durante 30 minutos.
- Resuspender el MitoSOX en 13 μ L de DMSO (5mM). Luego preparar una solución al 2,5 μ M de MitoSOX utilizando medio fresco a 37°C.
- Aspirar e incubar las células con la solución anterior a 37°C durante 15 minutos.
- Lavar las células con PBS 1x.

- Aspirar, lavar y tripsinizar, luego detener la tripsinización con medio fresco, recoger toda la suspensión en tubos de citómetro.
- Posteriormente con ayuda del personal de servicio de citometría del Parc Cientific realizar las mediciones en el citómetro Gallios (Beckman Coulter). Parámetros: MitoSOX es excitado a 488 nm y los datos son recogidos en el canal FSC, SSC, 585/42 nm (FL2) y 670LP (FL3), 5000 eventos. Los datos presentados por el histograma de la intensidad media de fluorescencia del MitoSOX se comparan con el control negativo con sonda (células no tratadas con Antimicina pero incubadas con MitoSOX).

2.5.4. Respiración mitocondrial

Para la determinación de la respiración mitocondrial se utilizó un instrumento desarrollado por Seahorse Biocience. A través de una prueba de estrés mitocondrial este equipo permite determinar parámetros claves de la función mitocondrial gracias a la medida directa de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) celular. La inducción del estrés se consigue por el uso de compuestos moduladores de la respiración mitocondrial que interaccionan con componentes claves de la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP. Estos compuestos son Oligomicina, FCCP y una mezcla de Rotenona y Antimicina A, cada uno de ellos es inyectado en serie para medir la respiración dependiente de ATP, la respiración máxima y la respiración no mitocondrial respectivamente. Posteriormente usando estos parámetros y la respiración basal se puede determinar la pérdida de protones (proton leak) y la capacidad respiratoria residual.

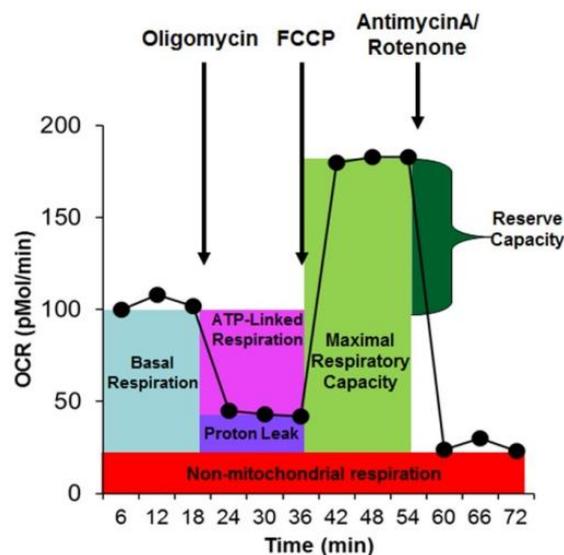


Figura X

Tal como se indicó, cada uno de los compuestos utilizados inhibe un componente específico de la respiración mitocondrial. Así por ejemplo, la Oligomicina inhibe a la ATP sintasa o complejo V de tal manera que tras su inyección causa una disminución en la tasa de consumo de oxígeno asociado a la producción celular de ATP. La carbonil *cianida-4-(trifluorometoxi)* fenilhidrazona (FCCP) es un agente desacoplante de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Debido a que este compuesto es bastante liposoluble difunde fácilmente a través de la membrana mitocondrial interna y permite el paso de protones, de esta manera colapsa el gradiente de pH e interrumpe el potencial de membrana mitocondrial. Como resultado, el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria no es reprimido y el oxígeno es consumido al máximo por el complejo IV. La OCR estimulada por FCCP puede usarse para calcular la capacidad respiratoria residual, que viene a ser la diferencia entre la respiración máxima y la respiración basal. La capacidad respiratoria residual es una medida de la capacidad de la célula para responder al aumento de la demanda de energía. Finalmente la última inyección es una mezcla de Rotenona, un inhibidor del complejo I, y Antimicina A, un inhibidor del complejo III. Esta combinación cierra la respiración mitocondrial y permite el cálculo de la respiración no mitocondrial.

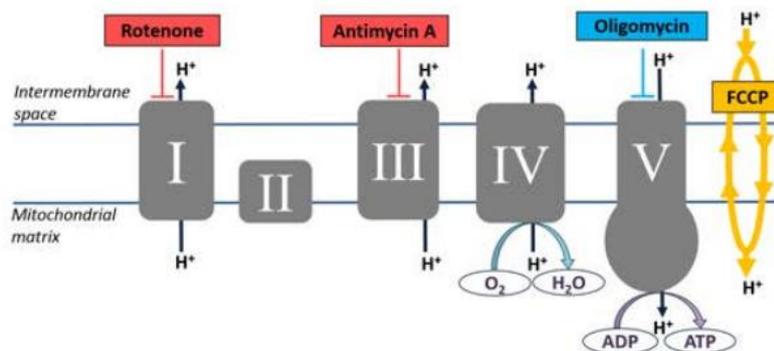


Figura X

A continuación se detalla el protocolo seguido de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Consideraciones iniciales:

1. Es importante determinar el número de células a sembrar debido a que el día que se realiza el ensayo toda la superficie del fondo de la placa de Seahorse debe encontrarse cubierta. Se recomienda determinar el número óptimo de células a sembrar utilizando una placa de 96 wells debido a que el área del pocillo de una placa de 96 wells es aproximadamente similar a la de una placa de Seahorse.
2. El primer experimento de Seahorse debe ser utilizado para determinar la concentración idónea de Oligomicina y FCCP.

- Día 1. Sembrar el número de células determinado en un volumen de 100 μ L en la placa de Seahorse. No se debe añadir células, únicamente medio, en los pocillos A1, B4, C3 y D6. Incubar a 37°C para permitir que las células se adhieran, al cabo de 1 hora añadir 150 μ L de medio de crecimiento fresco.
- Día 2. Hidratación de los sensores. Los sensores deben ser hidratados sumergiéndolos en una cubeta muy parecida a la placa utilizada para sembrar las células. Se deposita 1 mL de la solución de calibración Seahorse XF y luego se incuba a 37°C, sin corriente de CO₂ para evitar que la solución se evapore y los sensores no se hidraten correctamente. Adicionalmente se puede recubrir la placa con parafilm para evitar la evaporación.

Encender el equipo y dejar que alcance la temperatura de trabajo de 37°C hasta el día siguiente.

- Día 3. Calentar el medio base a 37°C, tomar 30 mL de este medio y añadir 300 μ L de una solución 2 mM de Glutamina y 150 μ L de una solución de Glucosa 1 M de tal manera que se obtiene una concentración final de 200 mM de Glutamina y 5 mM de Glucosa. Este será el medio fresco que se utilizará en el experimento.

Observar las células al microscopio. Lavar las células con PBS y luego con el medio fresco. Luego añadir 700 μ L del medio recién preparado en cada uno de los pocillos. Incubar a 37°C sin CO₂ por 1 hora.

Preparar los compuestos inhibidores de los complejos respiratorios, utilizando el medio fresco para obtener las diluciones finales.

Cargar 75 μL de los inhibidores en cada uno de los puertos. Para cada uno de los pocillos existen 4 puertos distribuidos alrededor de los sensores. En el caso de las condiciones establecidas en esta tesis se cargó de la siguiente manera:

1. Para células L6E9

Puerto D	Puerto C
Rotenona/Antimicina 10 μM	FCCP 40 μM
Puertos para L6E9	
Puerto B	Puerto A
FCCP 20 μM	Oligomicina 10 μM

2. Para células HeLa YFP-Parkin

Puerto D	
Rotenona/Antimicina 10 μM	
Puertos para HeLa YFP-Parkin	
Puerto B	Puerto A
FCCP 10 μM	Oligomicina 10 μM

Una vez cargados los puertos depositar la placa con los sensores en el equipo. Una vez los sensores se hayan calibrado el equipo pedirá que se coloque la placa con las células.

Al finalizar la prueba de estrés mitocondrial, aproximadamente unas 3 horas después, se retira la placa y se cuantifica la concentración proteica de las células. Para ello se elimina el medio, se lava con PBS y seguidamente se añade 200 μL de tampón RIPA. Con ayuda de una punta se rasca la placa y se homogeniza la solución. Posteriormente se realiza la cuantificación tal como se indica en el apartado 2.2.2, tomando 20 μL de la suspensión celular y

añadiendo 200 μ L de la solución Pierce, se deja incubar por 30 minutos y finalmente se realiza la lectura.

2.6. Análisis estadístico

Los datos en esta tesis están presentados como el promedio \pm el error estándar del promedio (SEM) de un número de entre 3 y 8 experimentos independientes. El test estadístico utilizado para evaluar las diferencias entre grupos ha sido la t de Student, de dos colas, considerándose estadísticamente significativo para $*p < 0,05$ como se indica en cada caso y el análisis One-way Anova. Los datos fueron analizados con el programa *GraphPad Prism* versión 6.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, G. F. G., Toth, R., James, J., & Ganley, I. G. (2013). Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy. *EMBO Reports*, 14(12), 1127–1135. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.168>
- Ashrafi, G., & Schwarz, T. L. (2012). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.81>
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., ... Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 182(4), 685–701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>
- Baker, M. J., Tatsuta, T., & Langer, T. (2011). Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007559>
- Baker, M. J., Tatsuta, T., & Langer, T. (2011). Quality Control of Mitochondrial Proteostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), a007559–a007559. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007559>
- Baumgartner, B. G., Orpinell, M., Duran, J., Ribas, V., Burghardt, H. E., Bach, D., ... Zorzano, A. (2007). Identification of a novel modulator of thyroid hormone receptor-mediated action. *PLoS One*, 2(11), e1183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001183>
- Berg, J. M. (Jeremy M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2008). *Bioquímica*. Reverté. Retrieved from https://books.google.es/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA652&lpg=PA652&dq=regla+de+l+N-terminal&source=bl&ots=LUyDL2Bify&sig=T07dtz5_vl545n6Lov58zxrTIV4&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwi3gLyzlPrSAhWMarRQKHf3FCkwQ6AEIUDAH#v=onepage&q=regla+del+N-terminal&f=false
- Boya, P., Reggiori, F., & Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*, 15(7), 713–20. <https://doi.org/10.1038/ncb2788>
- Cribbs, J. T., & Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Reports*, 8(10), 939–944. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401062>

- Dong, H., Cheung, S. H., Liang, Y., Wang, B., Ramalingam, R., Wang, P., ... Lam, Y. W. (2013). "Stainomics": Identification of mitotracker labeled proteins in mammalian cells. *ELECTROPHORESIS*, 34(13), 1957–1964. <https://doi.org/10.1002/elps.201200557>
- Duchen, M. R. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(4), 365–451. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.03.001>
- Fischer, F., Hamann, A., Osiewacz, H. D., Brand, M. D., Baker, B. M., Haynes, C. M., ... Hekimi, S. (2012). Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(7), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.02.004>
- Francis, V. A., Zorzano, A., & Teleman, A. A. (2010). dDOR is an EcR coactivator that forms a feed-forward loop connecting insulin and ecdysone signaling. *Current Biology: CB*, 20(20), 1799–808. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.055>
- Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), 335–343. <https://doi.org/10.1038/nature12985>
- Georgakopoulos, N. D., Wells, G., & Campanella, M. (2017). The pharmacological regulation of cellular mitophagy. *NATURE CHEMICAL BIOLOGY*, 13. <https://doi.org/DOI:10.1038/NCHEMBIO.2287>
- Gilkerson, R., Bravo, L., Garcia, I., Gaytan, N., Herrera, A., Maldonado, A., & Quintanilla, B. (2013). The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5), a011080. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011080>
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- Gonzalez-Hunt, C. P., Rooney, J. P., Ryde, I. T., Anbalagan, C., Joglekar, R., & Meyer, J. N. (2016). PCR-Based Analysis of Mitochondrial DNA Copy Number, Mitochondrial DNA Damage, and Nuclear DNA Damage. In *Current Protocols in Toxicology* (Vol. 67, p. 20.11.1-20.11.25). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2011s67>
- Hamacher-Brady, A., & Brady, N. R. (2016a). Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(4), 775–795. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2087-8>
- Hamacher-Brady, A., & Brady, N. R. (2016b). Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(4), 775–795. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2087-8>
- Hasson, S. A., Kane, L. A., Yamano, K., Huang, C.-H., Sliter, D. A., Buehler, E., ... Youle, R. J.

- (2013). High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. *Nature*, *504*(7479), 291–295. <https://doi.org/10.1038/nature12748>
- Heo, J.-M., Ordureau, A., Paulo, J. A., Rinehart, J., & Harper, J. W. (2015). The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.016>
- Herhaus, L., & Dikic, I. (2015). Expanding the ubiquitin code through post-translational modification. *EMBO Reports*, *16*(9), 1071–1083. <https://doi.org/10.15252/embr.201540891>
- Huang, R., Xu, Y., Wan, W., Shou, X., Qian, J., You, Z., ... Liu, W. (2015). Deacetylation of Nuclear LC3 Drives Autophagy Initiation under Starvation. *Molecular Cell*, *57*(3), 456–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.013>
- Iguchi, M., Kujuro, Y., Okatsu, K., Koyano, F., Kosako, H., Kimura, M., ... Matsuda, N. (2013). Parkin-catalyzed Ubiquitin-Ester Transfer Is Triggered by PINK1-dependent Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(30), 22019–22032. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.467530>
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., & Mizushima, N. (2012). Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *Journal of Cell Science*, *125*(6), 1488–1499. <https://doi.org/10.1242/jcs.094110>
- Kane, L. A., Lazarou, M., Fogel, A. I., Li, Y., Yamano, K., Sarraf, S. A., ... Youle, R. J. (2014). PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *The Journal of Cell Biology*, *205*(2), 143–53. <https://doi.org/10.1083/jcb.201402104>
- Kathrin Lutz, a., Exner, N., Fett, M. E., Schleke, J. S., Kloos, K., Lämmermann, K., ... Winklhofer, K. F. (2009). Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(34), 22938–22951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.035774>
- Kaur, J., & Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(8), 461–472. <https://doi.org/10.1038/nrm4024>
- Kaushik, S., Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kiffin, R., Martinez-Vicente, M., Kon, M., ... Cuervo, A. M. (2011). Chaperone-mediated autophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, *124*(Pt 4), 495–499. <https://doi.org/10.1242/jcs.073874>
- Kazlauskaite, A., Kondapalli, C., Gourlay, R., Campbell, D. G., Ritorto, M. S., Hofmann, K., ... Muqit, M. M. K. (2014). Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *The Biochemical Journal*, *460*(1), 127–39.

<https://doi.org/10.1042/BJ20140334>

- Kazlauskaitė, A., Martínez-Torres, R. J., Wilkie, S., Kumar, A., Peltier, J., Gonzalez, A., ... Muqit, M. M. (2015). Binding to serine 65-phosphorylated ubiquitin primes Parkin for optimal PINK1-dependent phosphorylation and activation. *EMBO Reports*, *16*(8), 939–954. <https://doi.org/10.15252/embr.201540352>
- Khaminets, A., Behl, C., & Dikic, I. (2015). Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.010>
- Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I., & Dikic, I. (2009). A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Molecular Cell*, *34*(3), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.026>
- Klionsky, D. J., & Schulman, B. A. (2014). Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, *21*(4), 336–45. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2787>
- Komander, D., & Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annual Review of Biochemistry*, *81*(1), 203–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060310-170328>
- Kondapalli, C., Kazlauskaitė, a., Zhang, N., Woodroof, H. I., Campbell, D. G., Gourlay, R., ... Muqit, M. M. K. (2012). PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biology*, *2*(5), 120080–120080. <https://doi.org/10.1098/rsob.120080>
- Koyano, F., & Matsuda, N. (2015). Molecular mechanisms underlying PINK1 and Parkin catalyzed ubiquitylation of substrates on damaged mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1853*(10 Pt B), 2791–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.009>
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., ... Matsuda, N. (2014a). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, *510*(7503), 162–6. <https://doi.org/10.1038/nature13392>
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., ... Matsuda, N. (2014b). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, *510*(7503), 162–6. <https://doi.org/10.1038/nature13392>
- Kumar, A., Aguirre, J. D., Condos, T. E. C., Martínez-torres, R. J., Chaugule, V. K., Toth, R., ... Walden, H. (2015). Disruption of the autoinhibited state primes the E 3 ligase parkin for activation and catalysis, 1–16.
- Lazarou, M., Sliter, D. a., Kane, L. a., Sarraf, S. a., Wang, C., Burman, J. L., ... Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature14893>
- Lee, E. J., Kang, Y. C., Park, W.-H., Jeong, J. H., & Pak, Y. K. (2014). Negative transcriptional regulation of mitochondrial transcription factor A (TFAM) by nuclear TFAM. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications*, 450(1), 166–171.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.082>
- Li, Q., Lau, A., Morris, T. J., Guo, L., Fordyce, C. B., & Stanley, E. F. (2004). A Syntaxin 1, G o, and N-Type Calcium Channel Complex at a Presynaptic Nerve Terminal: Analysis by Quantitative Immunocolocalization. *Journal of Neuroscience*, 24(16), 4070–4081.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0346-04.2004>
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., ... Chen, Q. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, 14(2), 177–185. <https://doi.org/10.1038/ncb2422>
- Liu, L., Sakakibara, K., Chen, Q., & Okamoto, K. (2014). Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Research*, 24(7), 787–95.
<https://doi.org/10.1038/cr.2014.75>
- Mauvezin, C., Orpinell, M., Francis, V. A., Mansilla, F., Duran, J., Ribas, V., ... Zorzano, A. (2010). The nuclear cofactor DOR regulates autophagy in mammalian and Drosophila cells. *EMBO Reports*, 11(1), 37–44. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.242>
- Mauvezin, C., Sancho, A., Ivanova, S., Palacin, M., & Zorzano, A. (2012). DOR undergoes nucleocytoplasmic shuttling, which involves passage through the nucleolus. *FEBS Letters*, 586(19), 3179–3186. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.032>
- McEwan, D. G., & Dikic, I. (2010). Not All Autophagy Membranes Are Created Equal. *Cell*, 141(4), 564–566. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.030>
- Metzger, M. B., Hristova, V. A., & Weissman, A. M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(3), 531–537.
<https://doi.org/10.1242/jcs.091777>
- Mishra, P., & Chan, D. C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(10), 634–646.
<https://doi.org/10.1038/nrm3877>
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Development*, 21(22), 2861–73. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011a). The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011b). The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Neufeld, T. P., & Baehrecke, E. H. (2008). Eating on the fly: function and regulation of

- autophagy during cell growth, survival and death in *Drosophila*. *Autophagy*, *4*(5), 557–62.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319640>
- Ney, P. a. (2015). Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.022>
- Ngo, H. B., Lovely, G. A., Phillips, R., & Chan, D. C. (2014). Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation. *Nature Communications*, *5*, 5816–5824. <https://doi.org/10.1038/ncomms4077>
- Nguyen, T. N., Padman, B. S., Lazarou, M., Exner, N., al., et, Kitada, T., ... al., et. (2016). Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends in Cell Biology*, *26*(10), 733–744. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.008>
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D. G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., ... Dikic, I. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Reports*, *11*(1), 45–51.
<https://doi.org/10.1038/embor.2009.256>
- Nowak, J., Archange, C., Tardivel-Lacombe, J., Pontarotti, P., Pebusque, M.-J., Vaccaro, M. I., ... Iovanna, J. L. (2009). The TP53INP2 Protein Is Required for Autophagy in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(3), 870–881. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-07-0671>
- Nunnari, J., Suomalainen, A., Ahlqvist, K. J., Hämäläinen, R. H., Yatsuga, S., Uutela, M., ... al., et. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, *148*(6), 1145–59.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- Okatsu, K., Oka, T., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., ... Matsuda, N. (2012). PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nature Communications*, *3*, 1016.
<https://doi.org/10.1038/ncomms2016>
- Ordureau, A., Sarraf, S. A., Duda, D. M., Heo, J.-M., Jedrychowski, M. P., Sviderskiy, V. O., ... Harper, J. W. (2014). Quantitative Proteomics Reveal a Feedforward Mechanism for Mitochondrial PARKIN Translocation and Ubiquitin Chain Synthesis. *Molecular Cell*, *56*(3), 360–375. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.007>
- Otsu, K., Murakawa, T., & Yamaguchi, O. (2015). BCL2L13 is a mammalian homolog of the yeast mitophagy receptor Atg32. *Autophagy*, *11*(10), 1932–1933.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1084459>
- Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2014). Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Experimental Gerontology*, *56*, 182–188.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.01.021>

- Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B., & Gelbard, H. A. (2011). Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*, *50*(2), 98–115. <https://doi.org/10.2144/000113610>
- Pickrell, A. M., Youle, R. J., Abeliovich, H., Zarei, M., Rigbolt, K. T., Youle, R. J., ... Whitworth, A. J. (2015). The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, *85*(2), 257–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>
- Prakash, S., Inobe, T., Hatch, A. J., & Matouschek, A. (2009). Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes. *Nature Chemical Biology*, *5*(1), 29–36. <https://doi.org/10.1038/nchembio.130>
- Quirós, P. M., Mottis, A., & Auwerx, J. (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(4), 213–226. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.23>
- Rüb, C., Wilkening, A., & Voos, W. (2016). Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. *Cell and Tissue Research*, *367*(1), 111–123. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2485-8>
- Rüb, C., Wilkening, A., & Voos, W. (2016). Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. *Cell and Tissue Research*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2485-8>
- Rüb, C., Wilkening, A., & Voos, W. (2016). Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system. *Cell and Tissue Research*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2485-8>
- Sala, D., Ivanova, S., Plana, N., Ribas, V., Duran, J., Bach, D., ... Zorzano, A. (2014). Autophagy-regulating TP53INP2 mediates muscle wasting and is repressed in diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(5), 1914–1927. <https://doi.org/10.1172/JCI72327>
- Sancho, A., Duran, J., García-España, A., Mauvezin, C., Alemu, E. A., Lamark, T., ... Zorzano, A. (2012). DOR/Tp53inp2 and Tp53inp1 Constitute a Metazoan Gene Family Encoding Dual Regulators of Autophagy and Transcription. *PLoS ONE*, *7*(3), e34034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034034>
- Sauve, V., Lilov, A., Seirafi, M., Vranas, M., Rasool, S., Kozlov, G., ... Gehring, K. (2015). A Ubl/ubiquitin switch in the activation of Parkin. *The EMBO Journal*, *34*(20), 2492–2505. <https://doi.org/10.15252/emj.201592237>
- Scarpulla, R. C. (2008). Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. *Physiological Reviews*, *88*(2), 611–638. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2007>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

- Shiba-Fukushima, K., Arano, T., Matsumoto, G., Inoshita, T., Yoshida, S., Ishihama, Y., ... Imai, Y. (2014). Phosphorylation of Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. *PLoS Genetics*, *10*(12), e1004861. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004861>
- Shiba-Fukushima, K., Imai, Y., Yoshida, S., Ishihama, Y., Kanao, T., Sato, S., & Hattori, N. (2012). PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Scientific Reports*, *2*, 2853–2867. <https://doi.org/10.1038/srep01002>
- Shlevkov, E., & Schwarz, T. L. (2014). For Parkin, it's not all or nothing. *The EMBO Journal*, *33*(4), 277–9. <https://doi.org/10.1002/emboj.201387723>
- Smit, J. J., Sixma, T. K., Irp, H., & Ring, I. (2014). RBR E3 -ligases at work, *15*(2), 142–154.
- Spratt, D. E., Walden, H., & Shaw, G. S. (2014). RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *The Biochemical Journal*, *458*(3), 421–37. <https://doi.org/10.1042/BJ20140006>
- Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014a). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology*, *16*(6), 495–501. <https://doi.org/10.1038/ncb2979>
- Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014b). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology*, *16*(6), 495–501. <https://doi.org/10.1038/ncb2979>
- Tanaka, A., Cleland, M. M., Xu, S., Narendra, D. P., Suen, D.-F., Karbowski, M., & Youle, R. J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of Cell Biology*, *191*(7).
- Tatsuta, T. (2009). Protein quality control in mitochondria. *Journal of Biochemistry*, *146*(4), 455–461. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp122>
- Tatsuta, T., & Langer, T. (2008). Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *The EMBO Journal*, *27*(2), 306–314. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601972>
- Tooze, S. A., & Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology*, *12*(9), 831–835. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-831>
- Trempe, J.-F., Sauvé, V., Grenier, K., Seirafi, M., Tang, M. Y., Ménade, M., ... Gehring, K. (2013). Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science (New York, N.Y.)*, *340*(6139), 1451–5. <https://doi.org/10.1126/science.1237908>
- Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2011). Detecting Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction (pp. 93–103). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_8
- Voigt, A., Berlemann, L. A., & Winklhofer, K. F. (2016). The mitochondrial kinase PINK1: functions beyond mitophagy. *Journal of Neurochemistry*, *139*(S1), 232–239.

<https://doi.org/10.1111/jnc.13655>

- Walden, H., & Martinez-Torres, R. J. (2012). Regulation of Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(18), 3053–3067. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0978-5>
- Wang, Y., Li, L., Hou, C., Lai, Y., Long, J., Liu, J., ... Diao, J. (2016). SNARE-mediated membrane fusion in autophagy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *60*, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.009>
- Wauer, T., Simicek, M., Schubert, A., & Komander, D. (2015). Mechanism of phospho-ubiquitin-induced PARKIN activation. *Nature*, *524*(7565), 370–374. <https://doi.org/10.1038/nature14879>
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(12), 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- Wild, P., McEwan, D. G., & Dikic, I. (2014). The LC3 interactome at a glance. *Journal of Cell Science*, *127*(Pt 1), 3–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.140426>
- Winklhofer, K. F. (2014a). Parkin and mitochondrial quality control: toward assembling the puzzle. *Trends in Cell Biology*, *24*(6), 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.01.001>
- Winklhofer, K. F. (2014b). Parkin and mitochondrial quality control: toward assembling the puzzle. *Trends in Cell Biology*, *24*(6), 332–41. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.01.001>
- Wojtala, A., Bonora, M., Malinska, D., Pinton, P., Duszyński, J., & Wieckowski, M. R. (2014). Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. In *Methods in enzymology* (Vol. 542, pp. 243–262). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00013-3>
- Wu, H., Xue, D., Chen, G., Han, Z., Huang, L., Zhu, C., ... Chen, Q. (2014). The BCL2L1 and PGAM5 axis defines hypoxia-induced receptor-mediated mitophagy. *Autophagy*, *10*(10), 1712–1725. <https://doi.org/10.4161/auto.29568>
- Xu, Y., Wan, W., Shou, X., Huang, R., You, Z., Shou, Y., ... Liu, W. (2016). TP53INP2/DOR, a mediator of cell autophagy, promotes rDNA transcription via facilitating the assembly of the POLR1/RNA polymerase I preinitiation complex at rDNA promoters. *Autophagy*, *12*(7), 1118–1128. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1175693>
- Yamano, K., Matsuda, N., & Tanaka, K. (2016). The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. *EMBO Reports*, *17*(3), 300–316. <https://doi.org/10.15252/embr.201541486>
- Yamano, K., Matsuda, N., Tanaka, K., Okamoto, K., Shaw, J., Tatsuta, T., ... Hiraoka, Y. (2016). The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. *EMBO Reports*, *17*(3), 300–16. <https://doi.org/10.15252/embr.201541486>

- Yoshii, S. R., Kishi, C., Ishihara, N., & Mizushima, N. (2011). Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19630–19640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.209338>
- Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011a). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>
- Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011b). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(1), 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>
- Zhang, W., Wu, H., Liu, L., Zhu, Y., & Chen, Q. (2013). Phosphorylation Events in Selective Mitophagy: Possible Biochemical Markers? *Current Pathobiology Reports*, 1(4), 273–282. <https://doi.org/10.1007/s40139-013-0033-8>

Anexos

1. Análisis de localización de diferentes formas de TP53INP2

Tras analizar que TP53INP2 es reclutado fuera del núcleo, en condiciones de despolarización de la membrana interna mitocondrial, en un tiempo más corto cuando las células expresan Parkin de manera estable, decidimos analizar la localización de ciertas formas mutantes de TP53INP2 disponibles en el laboratorio bajo estas mismas condiciones.

“full length”

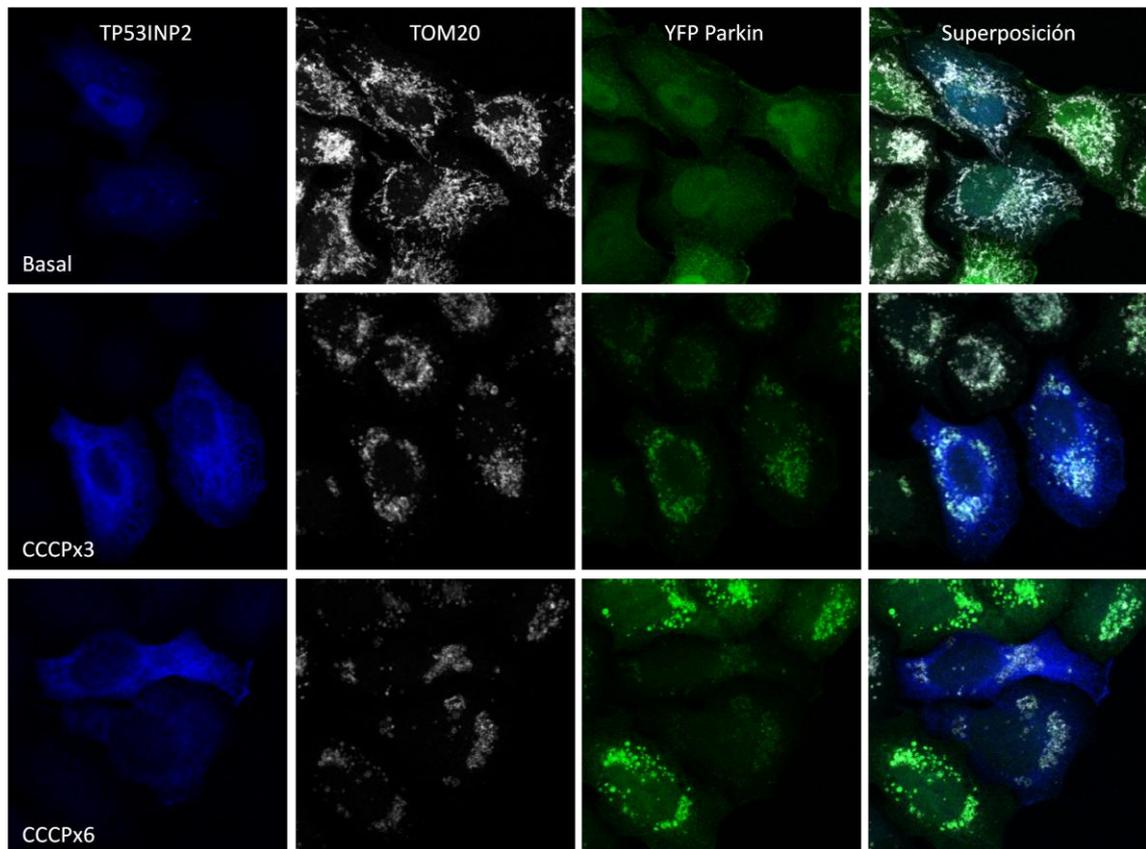


Figura A1. Localización de una forma “full length” de TP53INP2 en condiciones de despolarización. Las células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transfectadas con Gal4-h TP53INP2 (1-220). 24 horas después fueron incubadas en medio conteniendo CCCP a una concentración de 30 μ M durante 0h, 3h y 6h. Posteriormente las células fueron teñidas con anticuerpos TOM20 (blanco) y TP53INP2 (azul). Se presentan las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

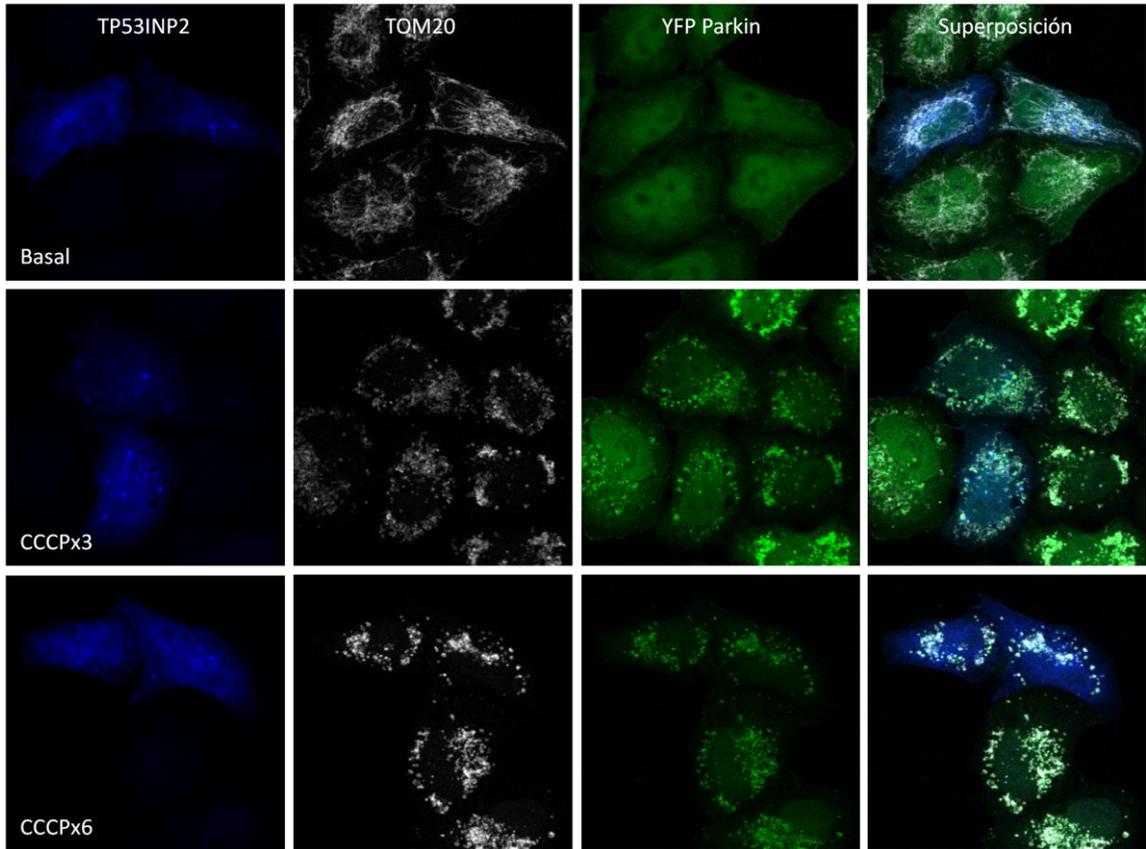


Figura A2. Localización de la forma corta 1-120 de TP53INP2 en condiciones de despolarización. Las células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transfectadas con Gal4-h TP53INP2 (1-120). 24 horas después fueron incubadas en medio conteniendo CCCP a una concentración de 30 μ M durante 0h, 3h y 6h. Posteriormente las células fueron teñidas con anticuerpos TOM20 (blanco) y TP53INP2 (azul). Se presentan las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

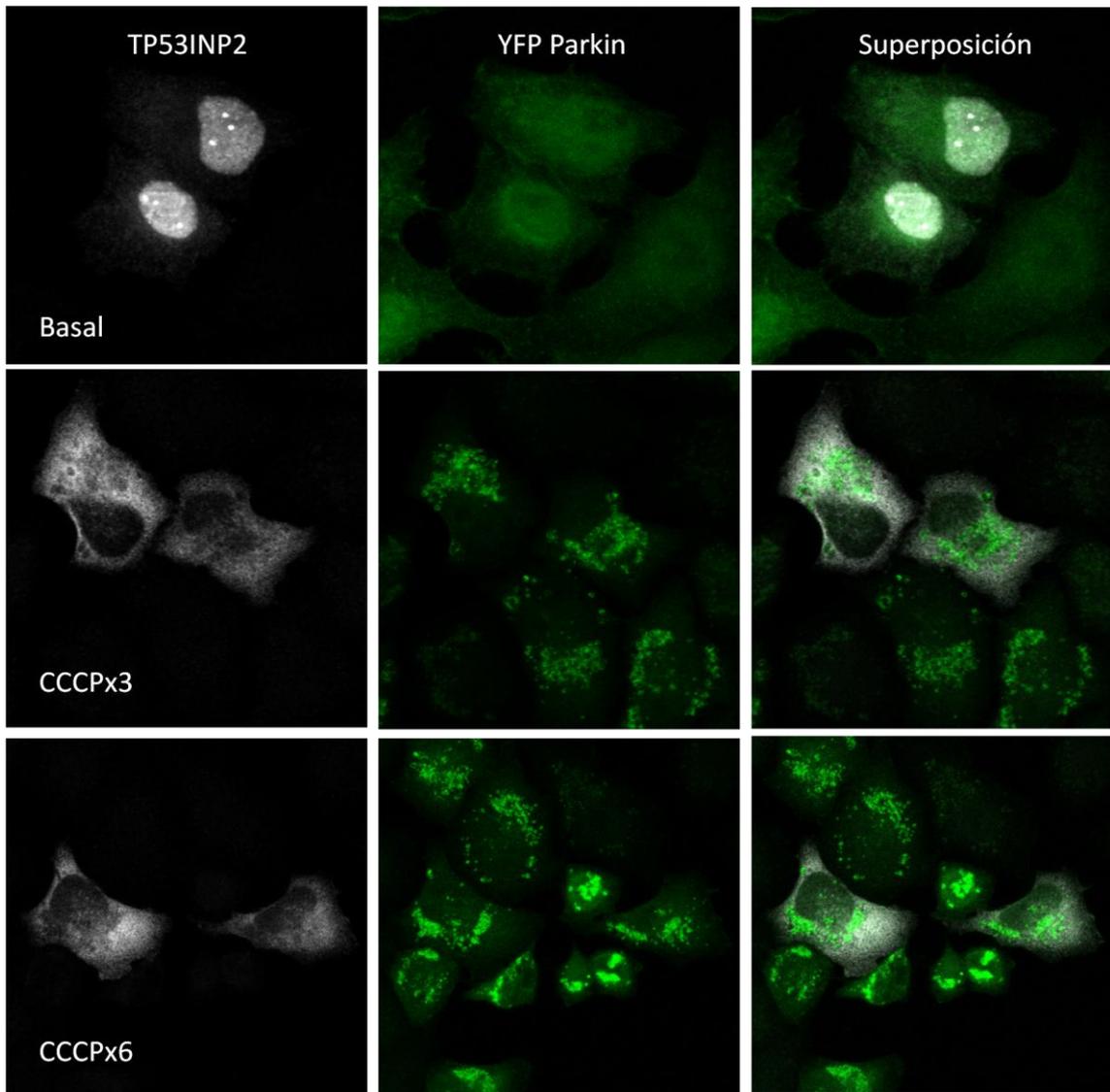


Figura A3. Localización de la forma corta 120-220 de TP53INP2 en condiciones de despolarización. Las células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transfectadas con Gal4-h TP53INP2 (1-120). 24 horas después fueron incubadas en medio conteniendo CCCP a una concentración de 30 μ M durante 0h, 3h y 6h. Posteriormente las células fueron teñidas con anticuerpo Gal4 (blanco). Se presentan las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

2. Análisis de diferentes métodos para establecer mitofagia

Luego de observar que TP53INP2 es reclutado a la mitocondria en diferentes condiciones y dado que a día de hoy no existe un consenso sobre cuál es el método más idóneo para estudiar la autofagia mitocondrial decidimos analizar algunos de los métodos disponibles en la literatura.

h) Microscopia confocal – co-localización

Un método utilizado para determinar mitofagia es a través del estudio de la co-localización de sondas o marcadores mitocondriales con elementos de la maquinaria autofágica, por lo general el marcador específico de los autofagosomas, la proteína LC3.

De manera preliminar, en células HeLa MitoDsRed, estudiamos la co-localización de GFP-LC3 y MitoDsRed. Las células utilizadas fueron transfectadas con un vector vacío y GFP-LC3. Para la determinación de la colocalización utilizamos el programa Image J y el plugin “Intensity Correlation Analysis” (ICA) creado por Tony Collins, McMaster University, Ontario, (Li et al., 2004). Los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos con el plugin en las células analizadas fueron utilizados para construir el gráfico que se muestra en la Figura A4.

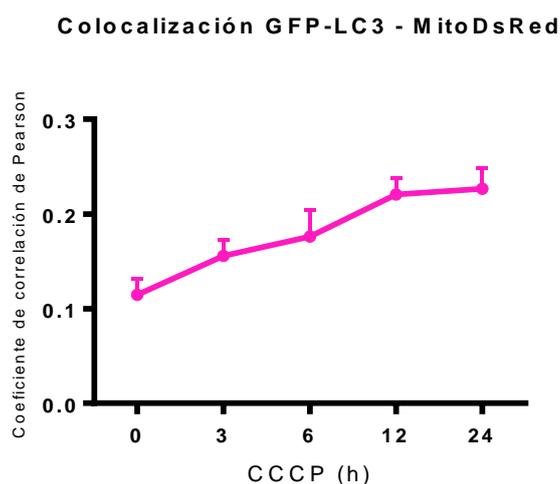


Figura A4. Co-localización de GFP-LC3 y MitoDsRed a diferentes tiempos. Las células HeLa que expresan de manera estable MitoDsRed fueron transfectadas con pcDNA3 y GFP-LC3. Posteriormente fueron incubadas en medio conteniendo CCCP a una concentración de 30 μ M durante 0h, 3h, 6h, 12h y 24h. La colocalización intracelular fue analizada utilizando el plugin “Intensity correlation analysis” del programa Image J. Los valores del coeficiente de correlación de Pearson obtenidos para cada condición fueron utilizados para elaborar este gráfico. Se muestra la media y el error estándar de la media.

Los valores del coeficiente de correlación de Pearson van desde 1, para aquel par de imágenes cuyas intensidades de fluorescencia están perfectamente relacionadas de manera lineal, a -1, para el par de imágenes cuyas intensidades de fluorescencia son adecuadas, pero se encuentran inversamente relacionadas entre sí. Además, valores cercanos a cero refleja la distribución de sondas que no están correlacionadas entre sí,

es decir no existe una asociación entre la intensidad de una imagen A con una imagen B (Dunn, Kamocka, & McDonald, 2011).

La desventaja de esta técnica es que no todos los puntos de GFP-LC3 que se observan al microscopio representan autofagosomas algunos de ellos sólo son agregados de GFP-LC3. Por otra parte, una etapa previa a la utilización del plugin ICA involucra el procesamiento de la imagen para corregir zonas demasiado expuestas, este procedimiento se realiza de manera manual y puede ser bastante subjetivo por lo que no puede ser reproducido de la misma manera para todas las imágenes.

i) Análisis de proteínas mitocondriales por western blot

Otra manera de analizar la mitofagia es a través de la monitorización de la degradación de proteínas mitocondriales. Las proteínas seleccionadas para la evaluación fueron TIM44, una proteína que se encuentra parcialmente en la membrana interna y la matriz y dos proteínas de membrana externa: TOM20 y mitofusina 2. La monitorización de los niveles de proteínas se realizó por western blot.

Para este análisis utilizamos 3 modelos. El primer modelo utilizado fueron células HeLa que sobreexpresan pcDNA3 - GFP-LC3 (Figura A5).

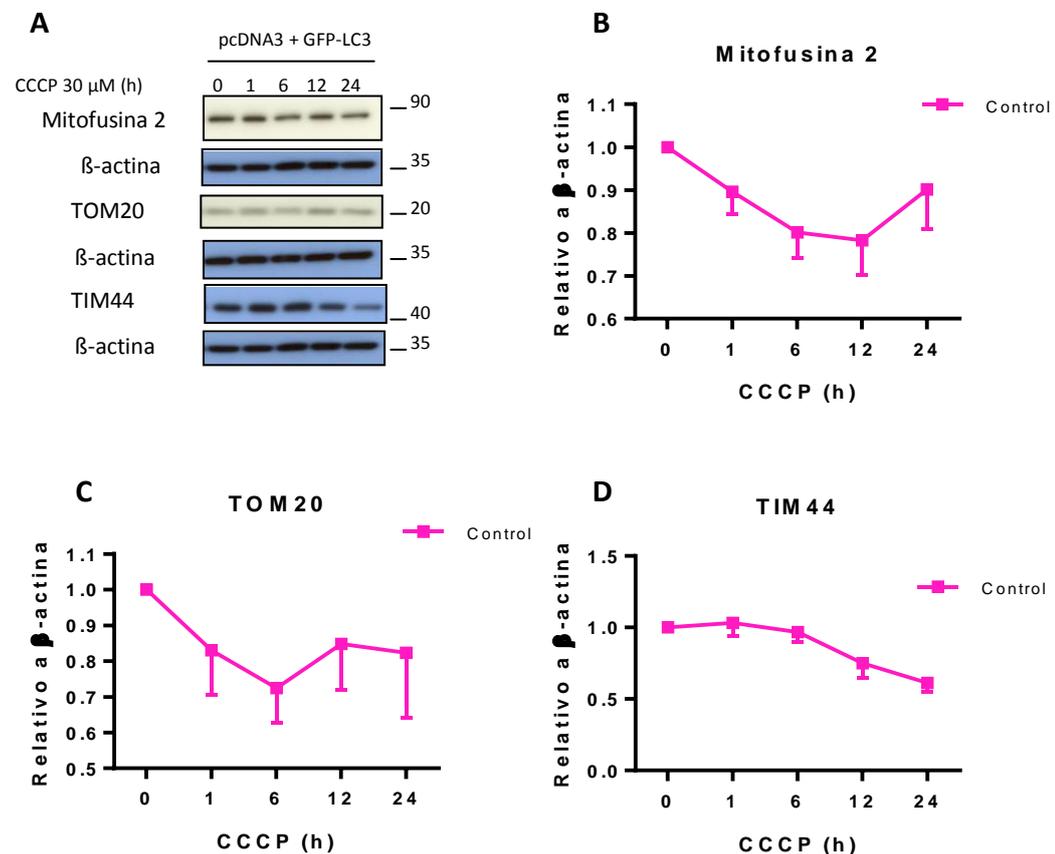


Figura A5. Efecto de la sobreexpresión de GFP-LC3 en la degradación mitocondrial en células HeLa MitoDsRed. En la Figura se muestra la cuantificación de los niveles de (B) Mitofusina 2, (C) TOM20 y (D) TIM44 por densitometría de diferentes análisis por western blot realizados con 50 μ g de proteínas provenientes de lisados totales. Estos lisados fueron obtenidos a partir de células HeLa que expresan de manera estable MitoDsRed, previamente transfectadas con pcDNA3 y GFP-LC3 e incubadas en medio con CCCP a una concentración de 30 μ M durante 0h, 1h, 6h, 12h y 24h. Se utilizaron anticuerpos específicos para la identificación de las proteínas y como control de carga se utilizó β -actina. Se muestra la media y el error estándar de la media de 6 experimentos independientes.

En estas condiciones no fue posible observar una degradación por encima del 50 %, es decir la tasa de degradación es muy baja, esto se debe sin duda a que estas células no parecen tener un mecanismo de degradación mitocondrial autofágico, al menos a día de hoy no se ha descrito ninguno.

El otro modelo utilizado fueron células HeLa que expresan YFP-Parkin de manera estable, transfectadas con pcDNA3 y GFP-LC3. Estas células fueron seleccionadas debido a que en éstas si se conoce el mecanismo de autofagia mitocondrial que ocurre. A continuación en la Figura A6 se muestran los niveles de proteína obtenidos.

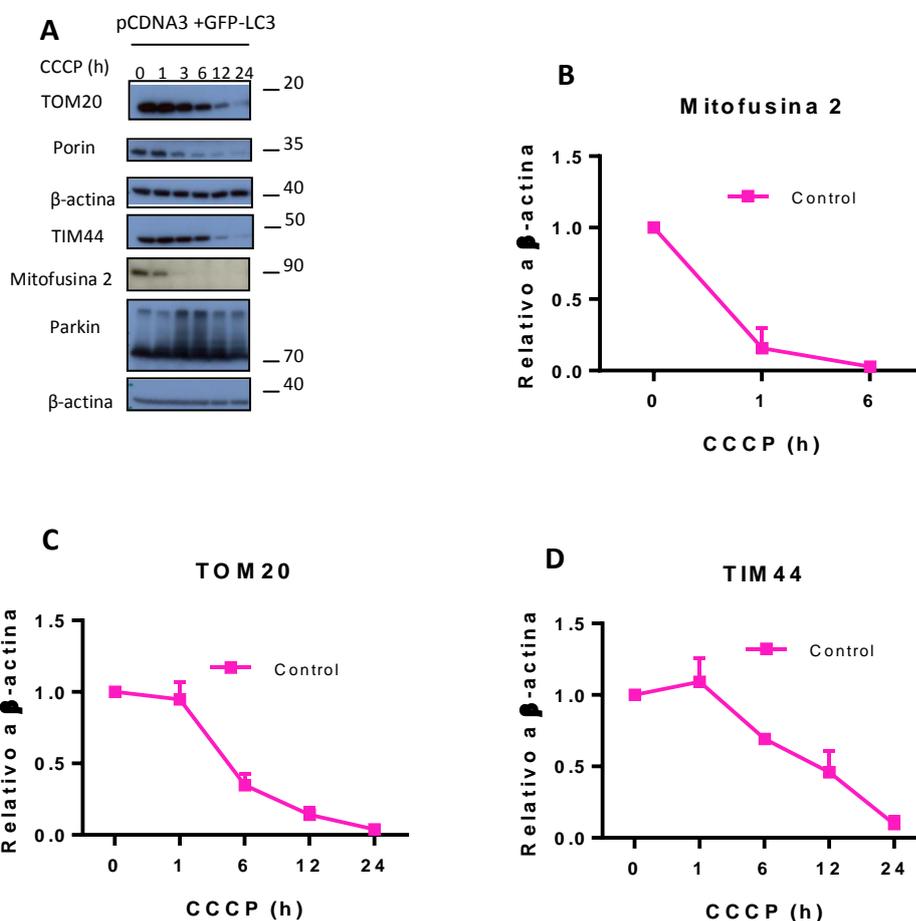


Figura A6. Efecto de la sobreexpresión de GFP-LC3 en la degradación mitocondrial de células HeLa YFP-Parkin. Las células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transfectadas con pcDNA3-GFP-LC3 (control, línea rosa) y TP53INP2-GFP-LC3 (TP53INP2, línea azul). Posteriormente fueron incubadas con CCCP 30 μ M durante 0h, 1h, 6h, 12h y 24h. 50 μ g de proteínas provenientes de lisados totales de estas células fueron analizados por western blot, utilizando anticuerpos específicos para (B) Mitofusina 2, (C) TOM20, (D) TIM44 y β -actina como control de carga. Se muestra el análisis densitométrico de 4 experimentos independientes, así como también la media y la desviación estándar de la media.

Así como se puede observar en la figura anterior, la tasa de degradación de las proteínas seleccionadas es bastante alta a diferencia del primer modelo utilizado.

El siguiente modelo analizado fueron células HeLa YFP-Parkin transducidas con adenovirus codificantes para LacZ, se estudió este modelo porque para inducir la sobreexpresión de la proteína de interés y conseguir una alta eficiencia es mejor esta metodología que la transfección transitoria mediante la utilización de un polímero catiónico. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura A7.

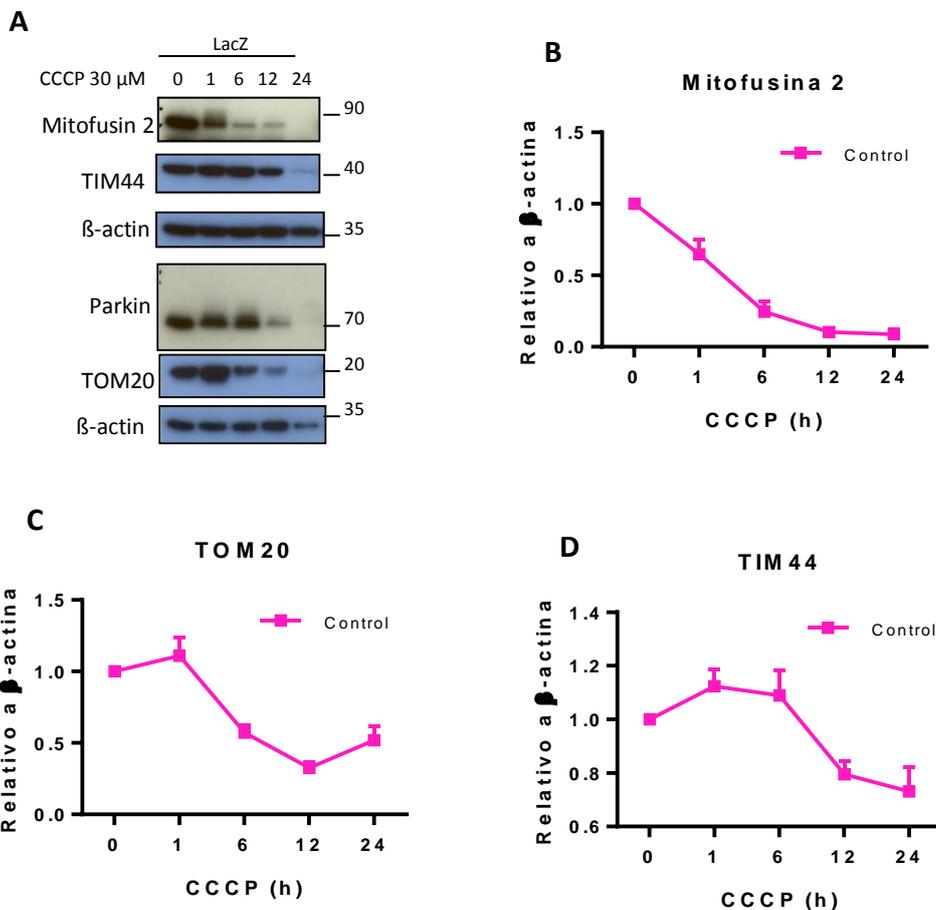


Figura A7. Efecto de la sobreexpresión de TP53INP2 en la degradación mitocondrial en células HeLa YFP-Parkin. Las células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transducidas con 50 MOI por células de adenovirus que codifican para GFP (control, línea rosa) y TP53INP2 (línea azul). 48h después fueron incubadas en medio con CCCP a una concentración de 30 μ M durante 0h, 1h, 6h, 12h y 24h. 50 μ g de proteínas provenientes de lisados totales de estas células fueron analizados por western blot, utilizando anticuerpos específicos para (A) Mitofusina 2, (B) TOM20, (C) TIM44 y β -actina como control de carga. Se muestra el análisis densitométrico de 8 experimentos independientes, así como también la media y la desviación estándar de la media.

La degradación en estas condiciones es más lenta que cuando se sobreexpresa GFP-LC3, especialmente si se observa los niveles de Mitofusina 2. Los resultados obtenidos siguiendo esta metodología muestran la degradación mitocondrial.

j) Análisis de la masa mitocondrial por citometría de flujo

Se realizaron ensayos preliminares siguiendo la técnica descrita por (Mauro Lizcano et al., 2015). Los autores de este método utilizan la sonda MitoTracker Deep Red para medir la masa mitocondrial en combinación con diferentes inhibidores de la autofagia.

Utilizando células HeLa YFP-Parkin transducidas con adenovirus codificante para GFP incubamos las células con CCCP para inducir daño mitocondrial y Bafilomicina para bloquear la autofagia. Además las células fueron incubadas previamente con la sonda MitoTracker Deep Red. En la Figura A8 se muestran los resultados obtenidos.

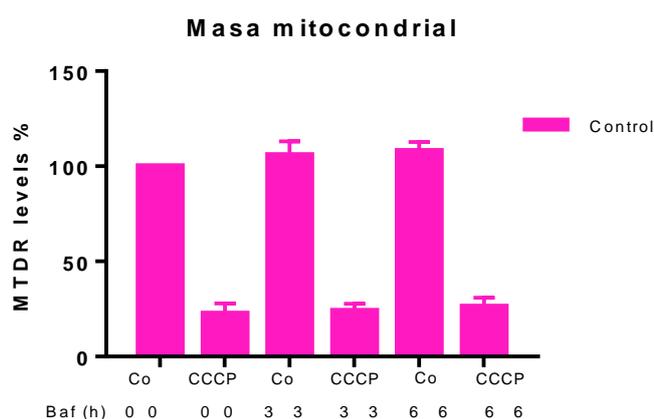


Figura A8. Análisis de la autofagia mitocondrial por citometría. Las células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transducidas con 50 MOI por células de adenovirus que codifican para GFP (control, barras de color rosa) y TP53INP2 (barras de color azul). 48h después fueron incubadas con CCCP 30 μ M (0 y 6h), Bafilomicina 200 nM (0, 3 y 6h) y CCCP (6h) + Bafilomicina (3 y 6h). Posteriormente fueron incubadas en medio con MitoTracker™ Deep Red a una concentración de 10 nM durante 15 minutos a 37°C. La medición de la fluorescencia se realizó utilizando el citómetro de flujo analizador Gallios

(Beckman Coulter). Se muestra la media y la desviación estándar de la media de 2 experimentos independientes realizados por duplicado.

Se puede apreciar que hay un ligero incremento de la masa de la masa respecto al basal, en aquellas células incubadas con Bafilomicina (3 y 6 horas). Sin embargo, no se aprecian cambios en aquellas células incubadas con CCCP y CCCP-Bafilomicina, en estas condiciones el nivel de la masa mitocondrial parece la misma. Estos resultados nos indicaron que esta técnica no es adecuada para nuestras condiciones de trabajo.

k) Análisis de nucleoides de ADN mitocondrial

El siguiente protocolo utilizado fue el reportado hace un par de años por (Lazarou et al., 2015). Esta técnica describe el uso de anticuerpos anti DNA para visualizar los nucleoides de ADN mitocondrial a través de inmunofluorescencia.

Siguiendo el protocolo descrito se utilizaron células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin transducidas con adenovirus que expresan para GFP. A continuación en la Figura A9 se presentan las imágenes representativas del experimento.

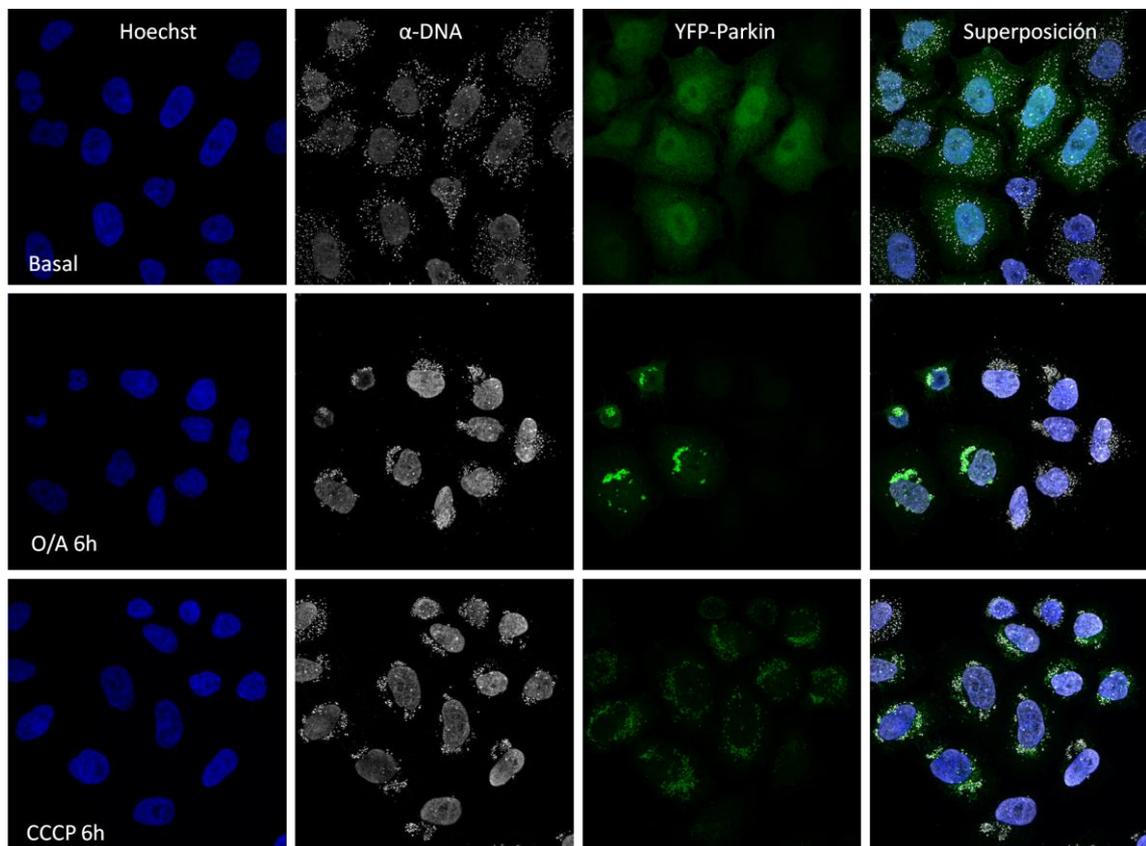


Figura A9. Análisis de la sobreexpresión de TP53INP2 en los nucleoides de DNA mitocondrial. Células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transducidas con 50 MOI por células de adenovirus que codifican para GFP. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con anticuerpo DNA (blanco), los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). En la figura, se muestran las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

Claramente se puede apreciar en la figura anterior la disminución de los nucleoides de DNA por efecto del tratamiento con los inhibidores de la cadena mitocondrial respiratoria (Oligomicina y Antimicina A) y el compuesto desacoplante CCCP.

3. Análisis de localización de TP53INP2 y ubiquitina

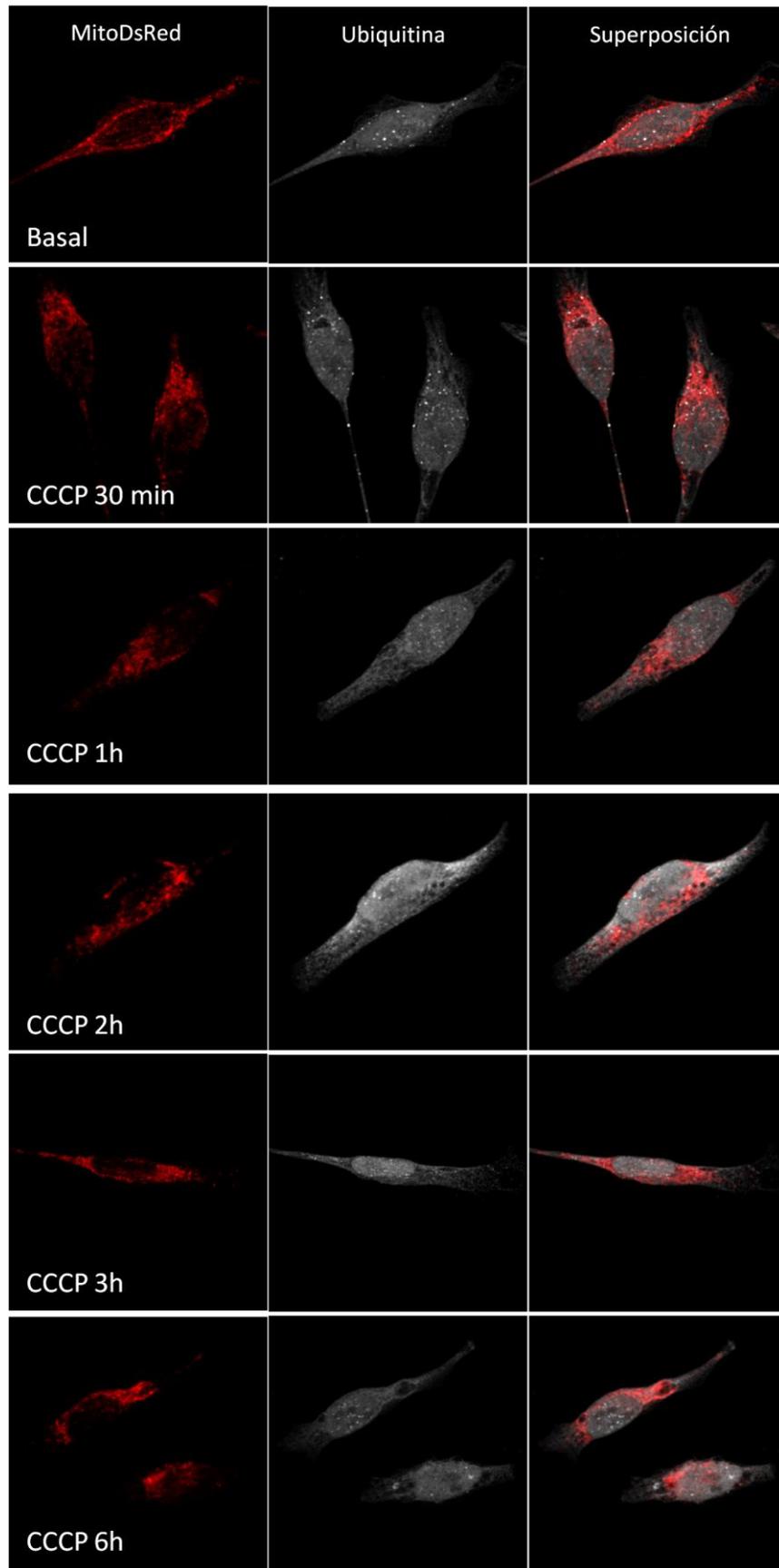


Figura A10. Localización de ubiquitina en células HeLa mitoDsRed. Células HeLa que expresan de manera estable MitoDsRed fueron transfectadas con pcDNA3, 24 horas después fueron incubadas con 30 μ M de CCCP a diferentes tiempos. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con anticuerpo ubiquitina

(blanco). En la figura, se muestran las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

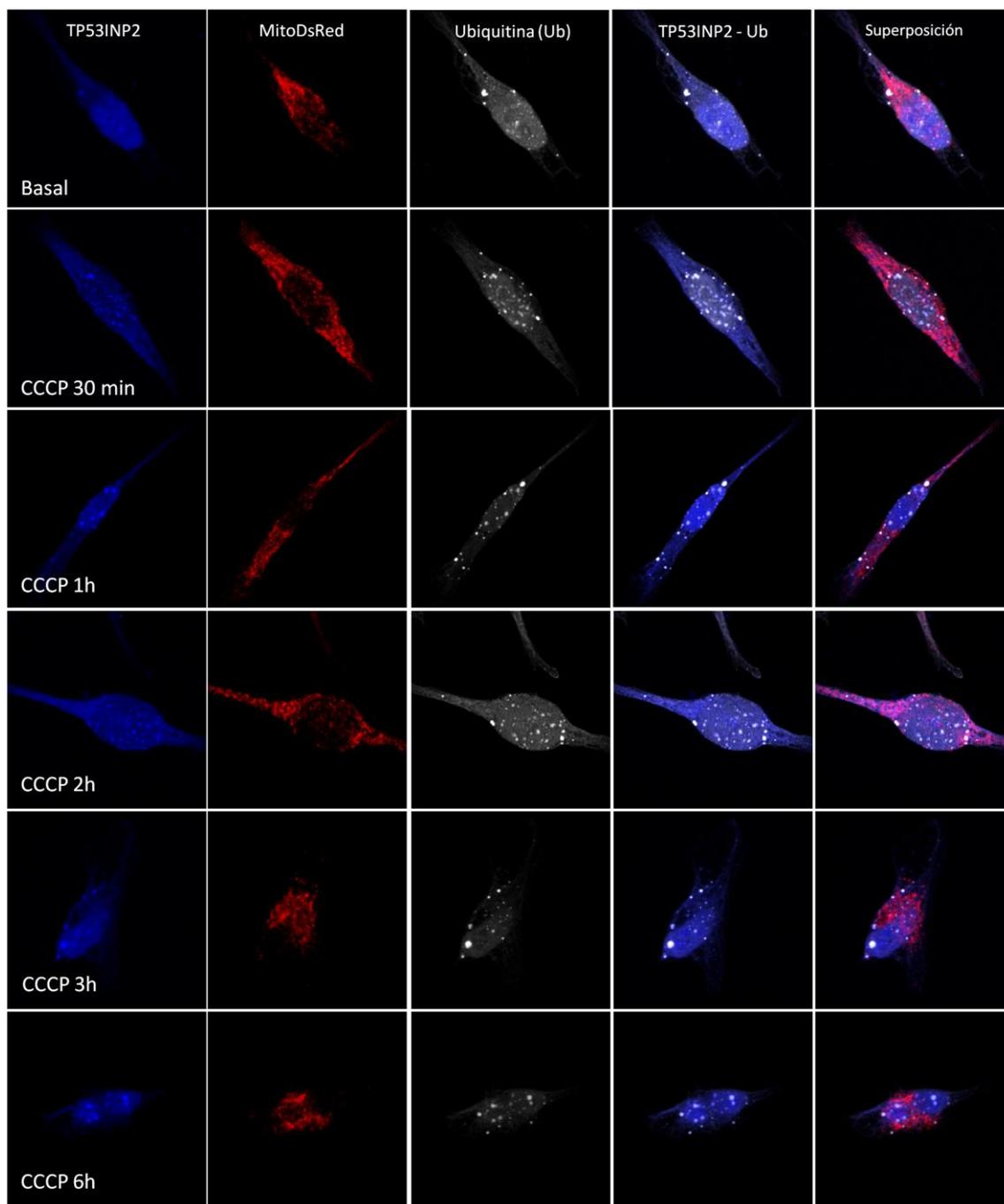


Figura A11. Localización de ubiquitina en células HeLa mitoDsRed transfectadas con TP53INP2. Células HeLa que expresan de manera estable MitoDsRed fueron transfectadas con TP53INP2, 24 horas después fueron incubadas con 30 μ M de CCCP a diferentes tiempos. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con anticuerpo ubiquitina (blanco) y TP53INP2 (azul). En la figura, se muestran las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

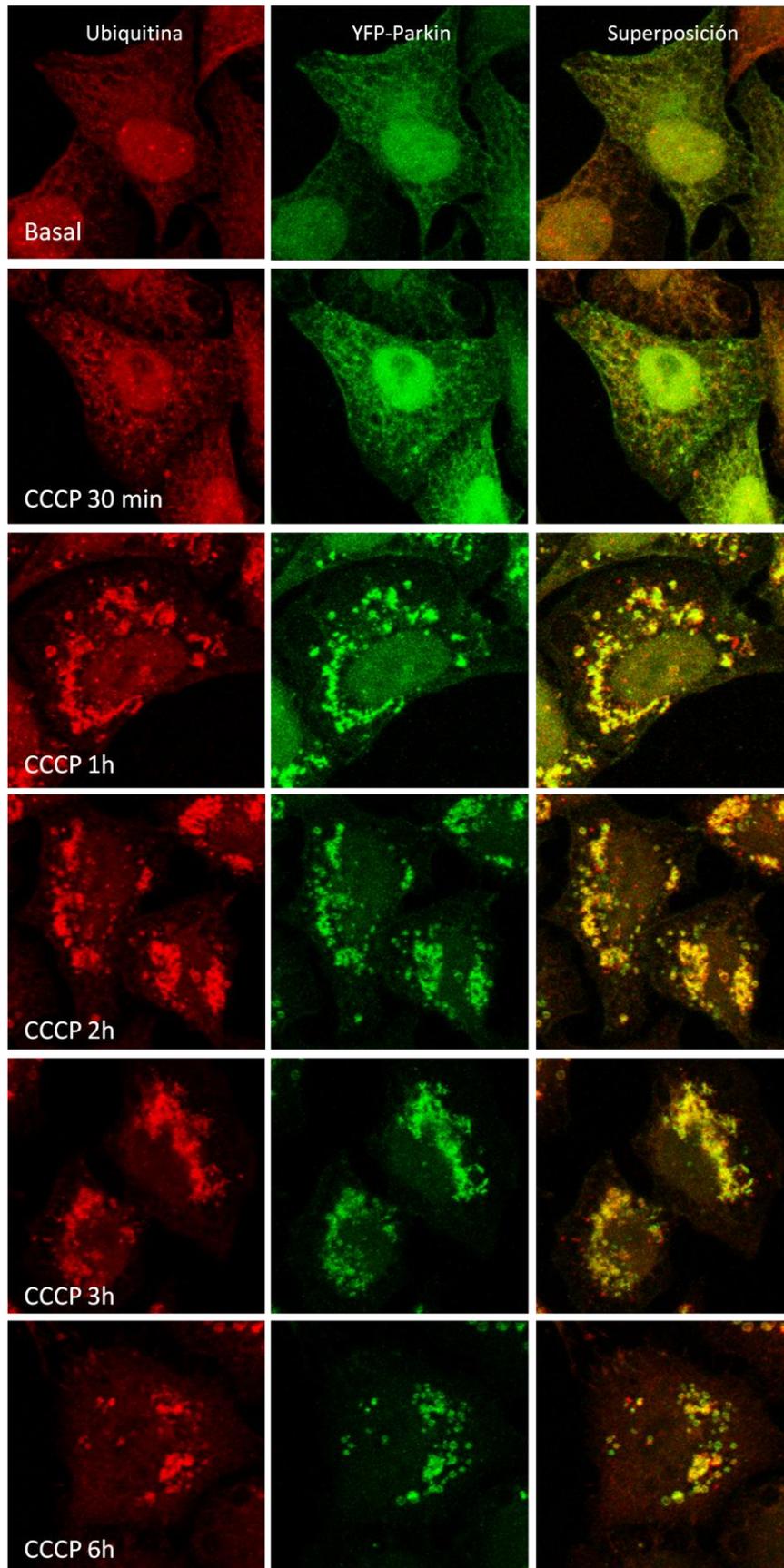


Figura A12. Localización de ubiquitina en células HeLa YFP-Parkin. Células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transfectadas con pcDNA3, 24 horas después fueron incubadas con 30 μ M de CCCP a diferentes tiempos. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con anticuerpo ubiquitina

(rojo). En la figura, se muestran las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.

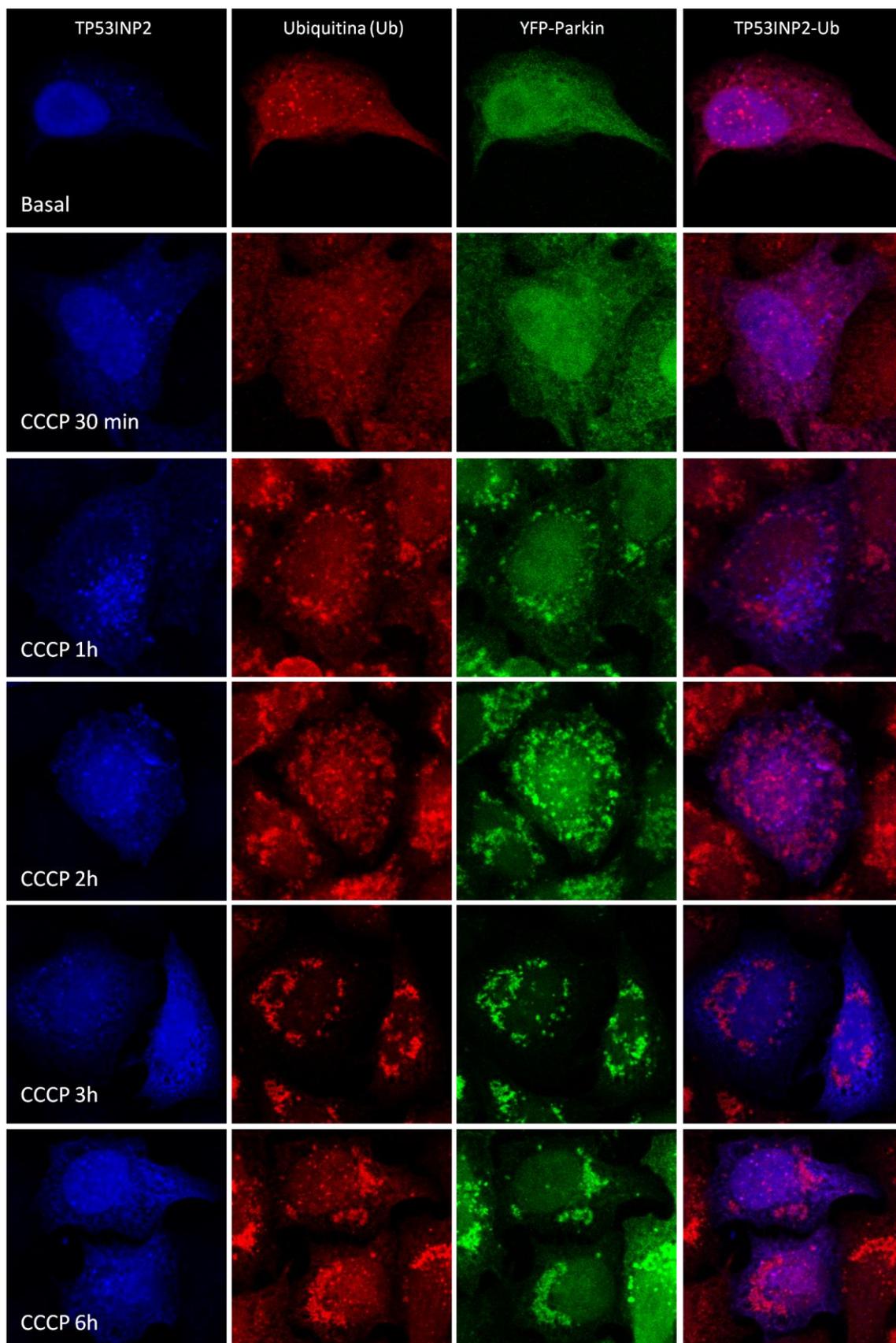


Figura A13. Localización de ubiquitina en células HeLa YFP-Parkin transfectadas con TP53INP2. Células HeLa que expresan de manera estable YFP-Parkin fueron transfectadas con TP53INP2, 24 horas después

fueron incubadas con 30 μM de CCCP a diferentes tiempos. Posteriormente las células fueron inmunoteñidas con anticuerpo ubiquitina (rojo) y TP53INP2 (azul). En la figura, se muestran las imágenes representativas superpuestas y en RGB, corregidas por contraste.