

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“REGULACIÓN DE LA COMPARTIMENTALIZACIÓN  
DE LA COMUNICACIÓN  
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO-MITOCONDRIA  
EN LA LÍNEA TUMORAL HELA”**

Tesis presentada para optar al grado académico de  
Doctor en Bioquímica por:

**ROBERTO FRANCISCO BRAVO SAGUA**

Directores de Tesis:

**Dr. Andrew F.G. Quest**

**Dr. Sergio Lavandero**

Santiago, Chile  
2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

**ROBERTO FRANCISCO BRAVO SAGUA**

Ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

Directores de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero \_\_\_\_\_

Dr. Andrew FG Quest \_\_\_\_\_

Comisión Informante de Tesis:

Dra. M. Antonieta Valenzuela P. (Presidenta) \_\_\_\_\_

Dra. Cecilia Hidalgo T. \_\_\_\_\_

Dr. Jorge Ferreira P. \_\_\_\_\_

Dr. Ariel Castro A. \_\_\_\_\_

Dedicada a Cristian,  
por su apoyo incondicional  
que hizo posible este trabajo

## PRESENTACIÓN

La presente tesis de doctorado fue dirigida por los Dres. Sergio Lavandero y Andrew F.G. Quest y se realizó conjuntamente en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y el Laboratorio de Comunicaciones Celulares del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Ambos laboratorios pertenecen al Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas (*Advanced Center for Chronic Diseases, ACCDiS*). Los experimentos de fraccionamiento subcelular se realizaron en el Laboratorio del Dr. Thomas Simmen del Department of Cell Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canadá.

A partir de la investigación desarrollada en esta tesis se realizaron las siguientes actividades y se generaron los siguientes productos:

### **Presentaciones a congresos nacionales e internacionales**

---

- **Bravo-Sagua R**, Rodríguez AE, Quiroga C, Paredes F, Parra V, Ortiz-Sandoval C, Simmen T, Quest AFG, Lavandero S. “Spatial regulation of ER-mitochondria crosstalk by Caveolin-1 and Protein kinase A during early ER stress”. Young Scientist Program satellite meeting. 20-22 Agosto, 2015. São Paulo, Brasil.

- **Bravo-Sagua R**, Rodríguez AE, Quiroga C, Paredes F, Parra V, Ortiz-Sandoval C, Simmen T, Quest AFG, Lavandero S. "Spatial regulation of ER-mitochondria crosstalk by Caveolin-1 and Protein kinase A during early ER stress". 23rd International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Con-gress y 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). 24 - 28 Agosto, 2015. Foz do Iguacu, Brasil.
- **Bravo-Sagua R**, Rodríguez AE, Quiroga C, Paredes F, Parra V, Ortiz-Sandoval C, Simmen T, Quest AFG, Lavandero S. "Regulation of ER-mitochondria communication during stress conditions in HeLa cells". EMBO Conference: The Endoplasmic Reticulum (ER) as a hub for organelle communication. 26 - 31 Octubre, 2014. Girona, España.
- **Bravo R**, Rodríguez A, Quiroga C, Paredes F, Parra V, Ortiz-Sandoval C, Simmen T, Quest AFG Lavandero S. "Caveolin-1 and Protein kinase A regulate ER-mitochondria communication during ER stress". XXXVII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. 30 Septiembre - 4 Octubre, 2014. Puerto Varas, Chile.
- **Bravo R**, Rodríguez AE, Quiroga C, Paredes F, Parra V, Ortiz-Sandoval C, Simmen T, Quest AFG, Lavandero S. "Protein kinase A regulates ER-mitochondria communication during stress conditions in HeLa cells". DynaMito2013, 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria. 28 Octubre - 1 Noviembre, 2013. Okinawa, Japón.
- **Bravo R**, Rodríguez AE, Quiroga C, Paredes F, Parra V, Ortiz-Sandoval C, Simmen T, Quest AFG, Lavandero S. "Protein kinase A regulates ER-mitochondria communication during stress conditions in HeLa cells". XII PABMB Congress, XLIX Annual Meeting of Sociedad Argentina de

Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), XXXVI Annual Meeting of Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (SBBM), 4th Meeting of the Latin-American Protein Society y LVI Annual Meeting of Sociedad de Biología de Chile. 9 - 14 Noviembre, 2013. Puerto Varas, Chile.

- **Bravo R**, Rodríguez A, Quiroga C, Paredes F, Parra V, Quest AFG Lavandero S. "Regulation of endoplasmic reticulum-mitochondria communication by Protein Kinase A in stressed HeLa cells". XXXV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. 2 - 5 Octubre, 2012. Puerto Varas, Chile.
- **Bravo R**, Rodríguez A, Quiroga C, Paredes F, Parra V, Quest AFG Lavandero S. "Differential regulation of endoplasmic reticulum-mitochondria coupling by mTOR inhibition and endoplasmic reticulum stress". XXXIV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. 27 - 30 Septiembre, 2011. Valdivia, Chile.

## Publicaciones

---

- **Bravo-Sagua R**, Parra V, Ortiz-Sandoval C, Rodríguez AE, Avalos Y, Sanhueza C, Rothermel BA, Simmen T, Quest AFG, Lavandero S. "Caveolin-1 impairs PKA signaling required for ER-mitochondria contact remodeling during the early phase of ER stress". (Manuscrito enviado a publicación).
- **Bravo-Sagua R\***, López-Crisosto C\*, Parra V, Rodríguez-Peña M, Rothermel BA, Quest AFG, Lavandero S. "ER stress and mTORC1

inhibition increase ER mitochondria coupling with different patterns of intracellular distribution”. \*Ambos autores contribuyen igualmente a este trabajo (Manuscrito enviado a publicación).

- **Bravo-Sagua R**, Torrealba N, Paredes F, Morales P, Pennanen C, López-Crisosto C, Troncoso R, Chiong M, Simmen T, Quest AF, Lavandero S. “Organelle communication: signaling crossroads of homeostasis and disease”. *Int J Biochem Cell Biol* 50:55-9, 2014.
- **Bravo R**, Parra V, Gatica D, Rodríguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AFG, Lavandero S. “Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration”. *Int Rev Cell Mol Biol* 301:215-90, 2013.
- **Bravo-Sagua R**, Rodríguez AE, Kuzmicic J, Gutiérrez T, López-Crisosto C, Quiroga C, Chiong M, Gillette TG, Rothermel BA, Lavandero S. “Cell death and survival through the endoplasmic reticulum-mitochondrial axis”. *Curr Mol Med* 13:317-29, 2013.
- **Bravo R**, Gutiérrez T, Paredes F, Gatica D, Rodríguez AE, Pedrozo Z, Chiong M, Parra V, Quest AF, Rothermel BA, Lavandero S. “Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics”. *Int J Biochem Cell Biol* 44:16-20, 2012.

## **PREMIOS, BECAS Y FINANCIAMIENTO**

### **Premio**

---

- Medalla Hermann Niemeyer al mejor estudiante de Doctorado del área Biología, 2012. Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile.

### **Becas**

---

Durante estos estudios de doctorado, la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) otorgó las siguientes becas:

- Beca CONICYT (21100028) para Estudios de Doctorado en Chile
- Beca CONICYT (24121339) de Apoyo a Realización de Tesis Doctoral
- Beca CONICYT (75130042) de Estadías Cortas de Investigación

### **Financiamiento**

---

Esta Tesis contó con las siguientes fuentes de financiamiento:

- Proyecto FONDECYT 1120212 al Dr. Sergio Lavandero
- Proyectos FONDAP 15010006 (CEMC) y FONDAP 15130011 (ACCDiS) a los Dres. Sergio Lavandero y Andrew FG Quest
- Proyecto Anillo de Investigación de Ciencia y Tecnología ACT1111 (NEMESIS) a los Dres. Sergio Lavandero y Andrew F.G. Quest.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis directores de tesis, Dres. Lavandero y Quest por su respaldo y excelente guía durante estos años de esfuerzo. Igualmente valoro la contribución de los miembros de la Comisión, Dra. María Antonieta Valenzuela, Dra. Cecilia Hidalgo, Dr. Jorge Ferreira y Dr. Ariel Castro, por sus agudos comentarios y excelente disposición.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, quienes nunca han dejado de brindarme su cariño y colaboración. Su pensamiento crítico y a la vez festivo aún acompañan todos mis pasos. De manera especial, agradezco al Sr. Fidel Albornoz, Sra. Gindra Latorre y Srta. Nicole Silva, por su imprescindible apoyo técnico, así como su maravillosa calidad humana. Además, agradezco a la Dra. Valentina Parra y las Srtas. Carolina Ortiz-Sandoval, Andrea E. Rodríguez y Yenniffer Ávalos, por su imprescindible apoyo en la experimentación realizada en esta tesis.

Agradezco a mi familia, a mis compañeros de doctorado, a mis amigas y amigos quienes me han acompañado y llenado de alegría. Constantemente me han apoyado, y me han ayudado a ser una persona mejor y más feliz.

Finalmente, agradezco de manera especial a mi pareja, Cristian Quezada, por su amor irrestricto que me permite salir adelante ante toda situación.

## TABLA DE CONTENIDOS

PRESENTACIÓN .....	iii
Presentaciones a congresos.....	iii
Publicaciones.....	v
PREMIOS, BECAS Y FINANCIAMIENTO.....	vii
Premio.....	vii
Becas.....	vii
Financiamiento.....	vii
AGRADECIMIENTOS .....	viii
TABLA DE CONTENIDO .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN .....	xv
SUMMARY .....	xvii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Retículo endoplásmico y plegamiento proteico .....	1
1.2. Mitocondria, metabolismo y muerte celular .....	5
1.3. Acoplamiento físico y funcional entre RE y mitocondria .....	9
1.4. Proteína quinasa A: regulador de la dinámica organelar .....	13
1.5. Caveolina-1 y dominios de señalización.....	15
2. HIPÓTESIS .....	19
3. OBJETIVOS .....	19
3.1. Objetivos específicos .....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
4.1. Reactivos, anticuerpos y sondas .....	20
4.2. Cultivo celular .....	21
4.3. Transfección transitoria.....	22

4.4. Transfección estable.....	22
4.5. Muestras para microscopía de inmunofluorescencia.....	23
4.6. Muestras para microscopía confocal en células vivas.....	23
4.7. Captura y procesamiento de imágenes .....	24
4.8. Microscopía electrónica .....	26
4.9. Oxigrafía .....	26
4.10. Extracción de proteínas totales.....	27
4.11. Fraccionamiento subcelular.....	28
4.12. Inmunoelectrotransferencia ( <i>western blot</i> ).....	30
4.13. Viabilidad celular.....	31
4.14. Análisis estadístico .....	31
5. RESULTADOS .....	33
5.1. Activación de PKA en la fase temprana del estrés de RE.....	33
5.2. Activación de PKA aumenta los contactos RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE .....	36
5.3. Caveolina-1 inhibe la comunicación RE-mitocondria.....	47
5.4. Caveolina-1 antagoniza la señalización de PKA en la fase temprana del estrés de RE .....	57
6. DISCUSIÓN .....	65
6.1. Proteína quinasa A y dinámica organelar .....	65
6.2. Cav1 y metabolismo celular.....	73
7. CONCLUSIONES.....	81
8. REFERENCIAS.....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y funciones del RE.....	2
Figura 2. Morfología mitocondrial.....	6
Figura 3. La mitocondria en la bioenergética y la muerte. ....	7
Figura 4. Participación de PKA en la elongación mitocondrial durante la fase temprana del estrés de RE.....	34
Figura 5. Fosforilación de DRP1 mediada por PKA en la fase temprana del estrés de RE.....	35
Figura 6. Formación de contactos RE-mitocondria mediada por PKA en la fase temprana del estrés de RE.....	38
Figura 7. PKA aumenta la comunicación RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE. ....	40
Figura 8. Xestospongina B y Ruthenium Red disminuyen la liberación de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial inducidas por histamina.....	42
Figura 9. AMPK no participa en la estimulación mitocondrial en la fase temprana del estrés de RE. ....	43
Figura 10. Efecto de forskolina en la proximidad mitocondria-RE y consumo de oxígeno.....	44
Figura 11. PKA determina la distribución mitocondrial en la fase temprana del estrés de RE.....	46
Figura 12. Caveolina-1 inhibe la formación de contactos RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE.....	47
Figura 13. Caveolina-1 inhibe la comunicación RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE. ....	49
Figura 14. Expresión de Cav1 no aumenta el estrés de RE. ....	51
Figura 15. Cav1 altera el remodelado de MAM en la fase temprana del estrés de RE. ....	53

Figura 16. Caveolina-1 está presente en los contactos RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE.....	55
Figura 17. Caveolina-1 está presente en las MAM en la fase temprana del estrés de RE.....	56
Figura 18. Cav1 inhibe la fusión mitocondrial mediada por PKA en la fase temprana del estrés de RE. ....	58
Figura 19. Cav1 altera la relocalización de PKA en la fase temprana del estrés de RE. ....	59
Figura 20. Cav1 altera la localización de la fosforilación de DRP1 en la fase temprana del estrés de RE.....	62
Figura 21. Los contactos RE-mitocondria regulan la viabilidad celular en la fase temprana del estrés de RE.....	64
Figura 22. Caveolina-1 antagoniza a PKA durante la fase temprana del estrés del RE.....	82

## ABREVIATURAS

AKAP	<i>A kinase anchoring protein</i> , proteínas de anclaje de PKA
Cav1	Caveolina-1
CCCP	carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona
Cnx	Calnexina
Comp C	compuesto C
Con	control
COX IV	Citocromo c oxidasa subunidad IV
$\Delta\psi$	potencial transmembrana mitocondrial
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> , medio Eagle modificado por Dulbecco
ETC	<i>electron transport chain</i> , cadena de transporte de electrones
FACL4	<i>Fatty acid-coenzyme A ligase 4</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , suero fetal bovino
Forsk	forskolina
IP <sub>3</sub> R	<i>IP<sub>3</sub> receptor</i> , receptor de IP <sub>3</sub>
MAM	<i>mitochondria-associated ER membranes</i> , membranas del RE asociadas a mitocondria
Mfn2	Mitofusina-2
Mito	mitocondria
Mock	transfectada con vector vacío
MPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i> , poro de transición mitocondrial
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , tampón fosfato salino
Peri	perinuclear
PKA	<i>cAMP-dependent protein kinase</i> , proteína quinasa dependiente de cAMP, Proteína quinasa A
Rap	rapamicina
RE	retículo endoplásmico
RFP	<i>Red fluorescent protein</i> , Proteína fluorescente roja

ROS	<i>reactive oxygen species</i> , especies reactivas del oxígeno
RYR	<i>Ryanodine receptor</i> , receptor de rianodina
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , docecil sulfato de sodio
SEM	<i>standard error of the mean</i> , error estándar de la media
SERCA	<i>Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i> , Ca <sup>2+</sup> -ATPasa del retículo sarco/endoplásmico
TTBS	TBS-Tween-20
Tun	tunicamicina
UPR	<i>unfolded protein response</i> , respuesta a proteínas mal plegadas

## RESUMEN

El retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria son organelos celulares que entablan una continua y dinámica conversación que permite a la célula responder coordinadamente a diversas situaciones fisiopatológicas. Datos previos de nuestro Laboratorio mostraron que ambos organelos incrementan los puntos de contacto físico durante la fase temprana del estrés de RE, permitiendo una mayor transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE hacia la mitocondria y estimulando así el metabolismo de este último organelo y favoreciendo la sobrevivencia celular. El presente proyecto estudió la participación de proteína quinasa A (PKA) y caveolina-1 (Cav1) como agentes reguladores de esta interacción física y funcional entre el RE y la mitocondria. Como modelo de estudio se utilizaron células HeLa tratadas con tunicamicina como agente inductor de estrés de RE por 4 h.

Primero, se investigó la participación de PKA en la fase temprana del estrés de RE. Esta quinasa se activó ante condiciones de estrés, medido por la fosforilación de DRP1 en Ser637 por Western blot y concomitante elongación mitocondrial (microscopía confocal). El inhibidor específico de PKA H89 previno estos cambios, comprobando que ambos son dependientes de PKA. Posteriormente, se estudió la participación de PKA en el acoplamiento RE-mitocondria a través de la medición de proximidad (microscopía confocal), contactos físicos (microscopía electrónica), transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (microscopía

de fluorescencia) y bioenergética mitocondrial (tasa de consumo de oxígeno). El papel de PKA en estos procesos se evaluó por modulación farmacológica con H89. Los resultados mostraron que la activación de PKA es necesaria para inducir la formación de contactos RE-mitocondria, y de esta forma, gatillar la respuesta adaptativa frente a estrés de RE.

Luego se investigó el papel de Cav1 sobre la interface RE-mitocondria. La expresión de Cav1 abolió completamente la respuesta adaptativa frente a estrés de RE temprano, evidenciado mediante proximidad entre organelos, transferencia de  $Ca^{2+}$  y respiración mitocondrial. Además de alterar esta plasticidad organelar frente a condiciones de estrés, la expresión de Cav1 disminuyó significativamente la bioenergética mitocondrial basal, junto con inducir un remodelado basal de la interface RE-mitocondria medido por purificación de las membranas del RE asociadas a mitocondria (MAM).

Finalmente, se determinó que la expresión de Cav1 antagonizó la señalización de PKA, impidiendo que ella fosforile a DRP1 y promueva la elongación mitocondrial en respuesta a estrés de RE. Más aún, mediante fraccionamiento subcelular, se estableció que Cav1 afectó la localización subcelular de PKA, evitando que se relocalice a las membranas microsomales en respuesta al estrés de RE. De este modo, Cav1 actúa como un regulador negativo de PKA, previniendo su activación frente a estrés de RE, evitando así la respuesta adaptativa celular.

## SUMMARY

The endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria are two organelles that continuously communicate between one another. This organelle crosstalk allows mitochondria and ER to coordinate responses to a variety of physiological and pathophysiological situations. Data from a previous work show that during the early phase of ER stress, both organelles increase their contact sites, augmenting thereby calcium transfer from ER to mitochondria. This response boosts mitochondrial bioenergetics and ultimately promotes cell survival. Here, we sought to study the role of Protein Kinase A (PKA) and Caveolin-1 (Cav1) as regulators of such organelle crosstalk. As an experimental model, HeLa cells were treated with tunicamycin to induce ER stress.

First, we observed that PKA was activated during early stages of ER stress, as assessed by increased phosphorylation of DRP1 at the inhibitory site Ser637 (Western blot), and that this event was followed by mitochondrial elongation (confocal microscopy). The specific PKA inhibitor H89 prevented these changes, thus confirming that they were due to PKA and not another kinase.

Subsequently, we studied ER-mitochondria coupling by evaluating organelle proximity (confocal microscopy), physical contact sites (electron microscopy),  $\text{Ca}^{2+}$  transfer (fluorescence microscopy) and mitochondrial bioenergetics (oxygen consumption rate). PKA was again involved in these

processes by pharmacological modulation using the inhibitor H89. Our results show that PKA activation is necessary to induce the formation of ER-mitochondria contacts and to trigger the adaptive metabolic responses to ER stress.

Next, we investigated the role of Cav1 as a modulator of the ER-mitochondria interface. Cav1 overexpression completely abolished the early adaptive response to ER stress, as assessed by evaluating the proximity between organelles, calcium transfer and mitochondrial respiration. In addition to altering organelle plasticity in response to stress conditions, Cav1 overexpression severely decreased baseline mitochondrial bioenergetics and induced basal remodelling of the ER-mitochondria interface, as determined by purification and analysis of mitochondria-associated ER membranes.

Finally, we determined that Cav1 overexpression antagonizes PKA signalling, preventing PKA-dependent DRP1 phosphorylation and mitochondrial elongation in response to ER stress. Moreover, subcellular fractionation revealed that Cav1 affected PKA localization, prevented redistribution to microsomal membranes in response to ER stress, and altered the pattern of DRP1 phosphorylation. Thus, Cav1 functions as a negative regulator of PKA that precludes PKA activation during early ER stress and thereby prevents the adaptive cellular response.

# 1. INTRODUCCIÓN

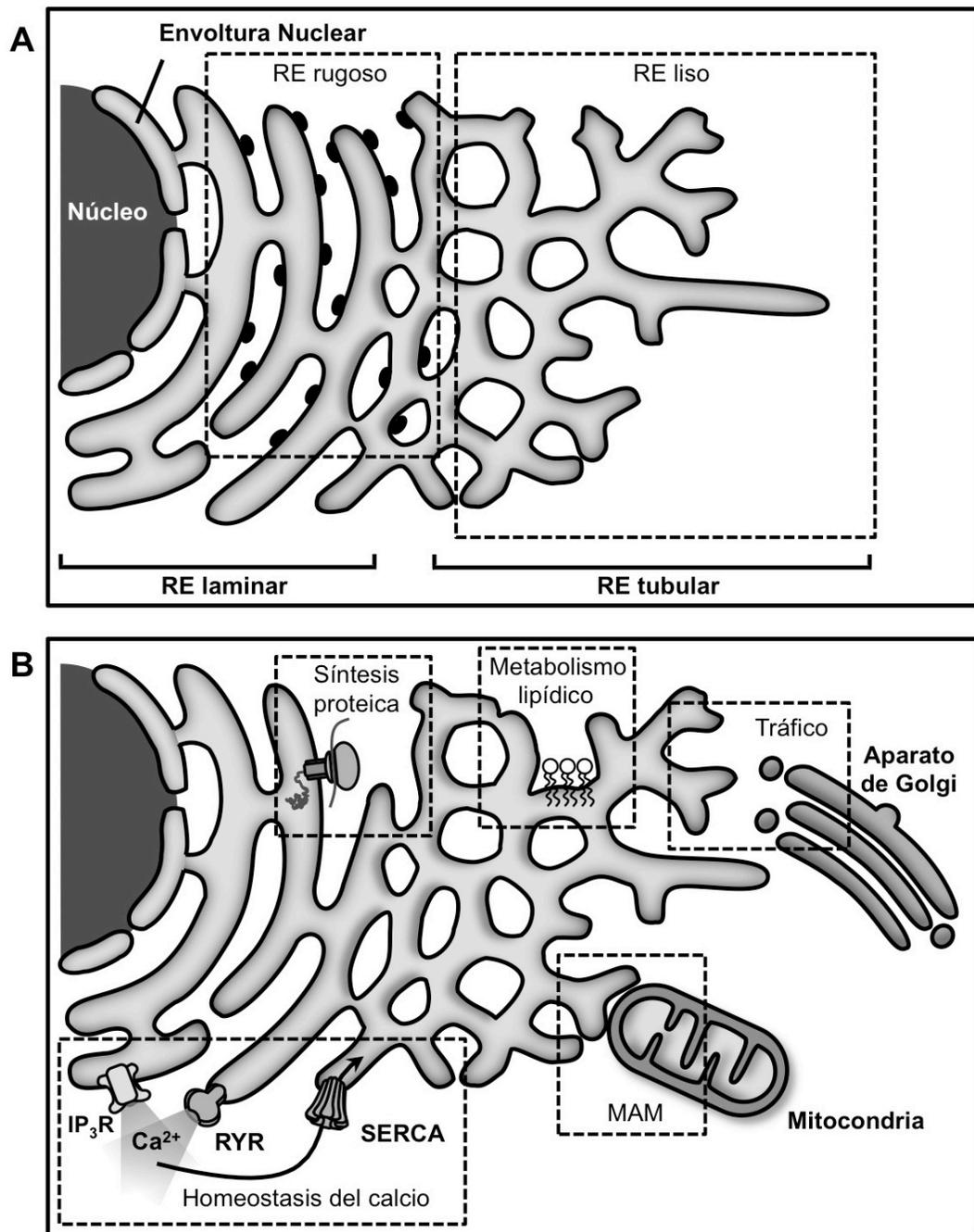
## 1.1. Retículo endoplásmico y plegamiento proteico

---

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo presente en casi todas las células eucariontes, siendo el compartimento intracelular más voluminoso [Alberts *et al.*, 2008]. Está delimitado por una bicapa lipídica (membrana) continua, formando una red tridimensional que se extiende desde la envoltura nuclear hasta regiones cercanas a la membrana plasmática.

A pesar de caracterizarse por su continuidad luminal, el RE es bastante heterogéneo en su estructura, presentando distintas regiones con funcionalidades particulares [Alberts *et al.*, 2008]. Las dos principales regiones del RE son el RE rugoso, de estructura laminar y dotado de ribosomas en su superficie, y el RE liso, desprovisto de ellos y de estructura predominantemente tubular (Figura 1A). El RE liso se encuentra asociado al metabolismo lipídico y a la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que en el RE rugoso tienen lugar la síntesis, plegamiento y control de calidad de proteínas (Figura 1B).

En los últimos años, la homeostasis proteica (proteostasis) en el RE ha sido objeto de múltiples investigaciones. Esto, no sólo por su importancia para diversos procesos fisiológicos de la célula, sino también porque alteraciones en esta fina homeostasis son la raíz de múltiples enfermedades [de Brito & Scorrano, 2010].



**Figura 1. Estructura y funciones del RE.**

(A) Los retículos endoplásmicos (RE) rugoso y liso son las dos regiones principales de este organelo. (B) El RE tiene por funciones la síntesis proteica, metabolismo lipídico y homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ . Así mismo, se relaciona con otros organelos como el aparato de Golgi mediante tráfico vesicular y la mitocondria mediante dominios especializados. [Imagen adaptada de Bravo *et al.*, 2013]

El plegamiento proteico es un proceso complejo que requiere de un determinado ambiente iónico y redox en el lumen del RE, chaperonas que favorezcan el proceso termodinámicamente, y una maquinaria de control de calidad [Gutiérrez & Simmen, 2014a]. Una vez que una proteína ingresa al lumen del RE co-traduccionalmente, ésta experimenta distintas etapas de plegamiento hasta alcanzar su conformación nativa. Las chaperonas, como la proteína BiP, estabilizan estos intermediarios de plegamiento, evitando que se agreguen o que tomen rutas de mal plegamiento. La actividad de las chaperonas es crucial para el proceso, y requiere de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP.

Por otro lado y en forma paralela, en el RE ocurre la N-glicosilación de proteínas [Gutiérrez & Simmen, 2014a]. En este proceso, un oligosacárido se transfiere a las cadenas peptídicas, cumpliendo una función tanto estructural como de señalización. Una vez que ocurre la glicosilación, el oligosacárido se modifica según el estado de plegamiento de la proteína. Así, el oligosacárido reflejará si la proteína se encuentra bien plegada, en tránsito a plegarse o terminalmente mal plegada. Proteínas de control de calidad, como calnexina (Cnx), reconocen este código y retienen las proteínas en el lumen del RE mientras estén en vía de plegamiento. Si una proteína adquiere una estructura bien plegada, se destina al Aparato de Golgi a través de tráfico vesicular. En

caso contrario, las proteínas terminalmente mal plegadas son destinadas a su degradación.

Dependiendo de su tamaño, estado redox, niveles de ATP, sacáridos y abundancia de chaperonas en el lumen del RE, éste tiene la capacidad de plegar una cantidad limitada de proteínas cliente [Simmen *et al.*, 2010]. Cuando esta capacidad de plegamiento se excede, las proteínas mal plegadas comienzan a acumularse y se inicia una señalización de alarma. Esta condición se denomina “estrés de RE”, que puede producirse por una excesiva síntesis de proteínas, falla en la glicosilación proteica o perturbaciones en la regulación redox o del  $\text{Ca}^{2+}$  intraluminal. Bajo estas condiciones de estrés, el RE inicia una respuesta que busca restablecer su capacidad de plegamiento, llamada *respuesta a proteínas mal plegadas (unfolded protein response, UPR)*.

La UPR busca inicialmente restablecer la homeostasis celular, disminuyendo la síntesis de proteínas, aumentando la expresión de chaperonas y promoviendo la degradación de proteínas mal plegadas [Simmen *et al.*, 2010]. Sin embargo, si el estrés de RE es muy intenso o crónico, la célula inicia una cascada de señalización que conduce a su muerte por apoptosis. Esta vía apoptótica recluta a la mitocondria, la cual amplifica la señal de muerte al cambiar la permeabilidad de su membrana.

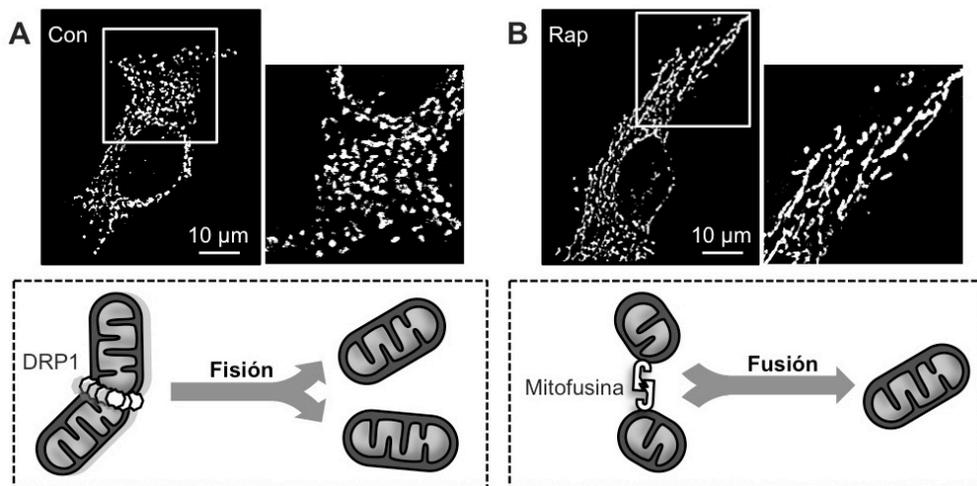
## 1.2. Mitocondria, metabolismo y muerte celular

---

Las mitocondrias son organelos delimitados por dos membranas, una externa, permeable a pequeñas moléculas, y una interna, selectiva al paso de solutos [Alberts *et al.*, 2008]. La membrana interna tiene pliegues denominados crestas mitocondriales, donde se organizan los complejos encargados de la síntesis de ATP. De esta forma, las membranas delimitan dos espacios al interior de las mitocondrias: un espacio intermembrana, de composición similar al citosol; y una matriz mitocondrial, de composición muy selecta, que contiene el DNA mitocondrial, almacena  $\text{Ca}^{2+}$  y compartimentaliza enzimas metabólicas, como las del ciclo de Krebs. Al interior de la célula, las mitocondrias no se encuentran como entidades aisladas [Ni *et al.*, 2015]. Existe entre las mitocondrias una relativa continuidad luminal, similar al RE. Sin embargo, la red mitocondrial es dinámica, siendo gobernada por eventos de fusión y fisión, los cuales aumentan o disminuyen, respectivamente, su estado de interconexión. De este modo, cuando la fusión es mayoritaria, las mitocondrias se elongan, adquiriendo la apariencia de un tallarín. En cambio, cuando predomina la fisión, las mitocondrias son más numerosas y pequeñas, similares a balines (Figura 2).

Una de las funciones principales de la mitocondria es el metabolismo energético. El acetil-CoA producido a partir de glucosa o ácidos grasos ingresa a la matriz mitocondrial, donde participa en el ciclo de Krebs [Nicholls & Ferguson, 2013]. La energía química del acetil-CoA se transforma en poder

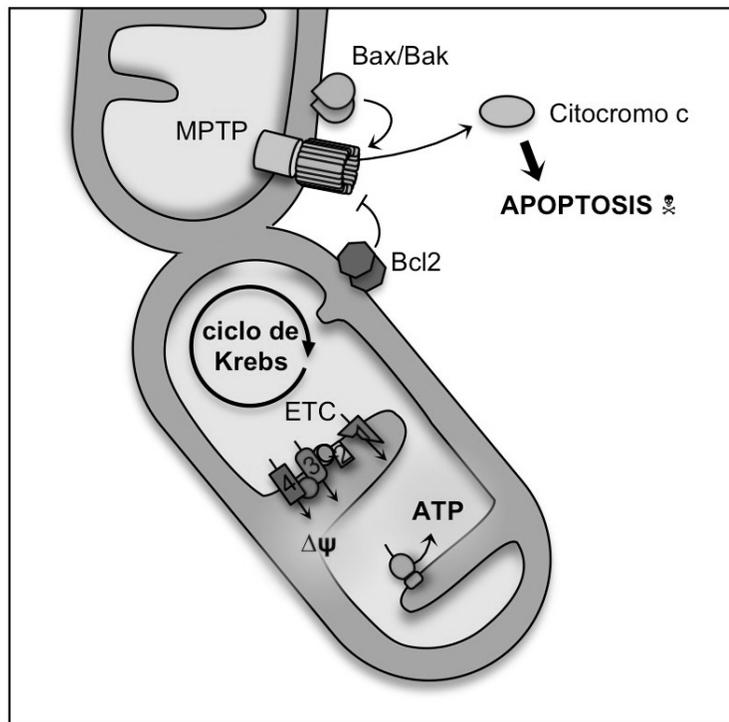
reductor, almacenado en NADH y FADH<sub>2</sub>. Posteriormente, en la membrana mitocondrial interna, ambas moléculas ceden sus electrones a una serie de complejos respiratorios (*electron transport chain*, ETC). El transporte de electrones a través de una cadena de reacciones redox va liberando gradualmente energía, la cual se usa para bombear protones al espacio intermembrana. Producto de ello, se forma un gradiente de protones hacia el interior de la matriz, denominado potencial mitocondrial ( $\Delta\psi$ ), cuya fuerza protón-motriz permite la síntesis de ATP a partir de ADP. Finalmente, los electrones son transferidos a una molécula de oxígeno como aceptor final, formando agua.



**Figura 2. Morfología mitocondrial.**

(A) Panel superior: células HeLa en condición control (Con) marcadas con la sonda fluorescente Mitotracker green. El inserto muestra la morfología mitocondrial fragmentada, en forma de balines. Panel inferior: representación de la fisión mitocondrial. (B) Panel superior: células HeLa tratadas con rapamicina 100 nM (Rap) marcadas con Mitotracker green. El inserto muestra la morfología mitocondrial elongada, en forma de tallarines. Panel inferior: representación de la fusión mitocondrial. Barra = 10 μm.

De esta forma, la mitocondria se transforma en una fuente eficiente de ATP, necesario para alimentar bombas de transporte, eventos de señalización, procesos mecánicos mediados por motores moleculares, síntesis y plegamiento de macromoléculas, entre otros. Sin embargo, la mitocondria no es sólo un centro energético celular, sino también un centro integrador de señales de vida y muerte celular, escenario en que adquiere un papel central (Figura 3) [Perl *et al.* 2005].



**Figura 3. La mitocondria en la bioenergética y la muerte.**

La mitocondria posee la maquinaria metabólica para realizar el ciclo de Krebs, el cual alimenta la cadena de transporte de electrones que genera el potencial mitocondrial necesario para sintetizar ATP. Por otro lado, la mitocondria integra señales anti y pro apoptóticas (Bcl2 y Bax/Bak, respectivamente) que regulan la permeabilidad mitocondrial, salida del citocromo c y así, la ejecución de la apoptosis [Figura adaptada de Bravo-Sagua *et al.*, 2013].

La apoptosis es un proceso de suicidio celular caracterizado por un desmantelamiento programado de estructuras, a través de la condensación del citosol, fragmentación nuclear y vesiculación de la membrana plasmática [Perl *et al.* 2005]. La decisión de ejecutar la apoptosis es altamente regulada, integrando señales extracelulares y del medio interno. La mitocondria tiene por función recibir distintas señales, ponderándolas antes de iniciar la apoptosis. Entre estas señales están las proteínas de la familia Bcl2, que actúan como sensores del estado general de la célula. En esta familia existen integrantes anti-apoptóticos, como Bcl2, y pro-apoptóticos, como Bax y Bak. El balance entre ambas facciones determina el destino celular. Sin embargo, las proteínas no son los únicos mensajeros que confluyen en la mitocondria. El  $\text{Ca}^{2+}$  y las ceramidas se acumulan en este organelo a medida que los estímulos pro-apoptóticos aumentan [Grimm, 2012]. En conjunto, la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , las ceramidas y las proteínas Bax/Bak llevan a la disfunción mitocondrial. Durante este evento se forma un poro en la superficie de la mitocondria, conocido como poro de transición de permeabilidad (*mitochondrial permeability transition pore*, MPTP), que altera la compartimentalización normal de este organelo, permitiendo el paso de grandes moléculas hacia el citosol. Esto lleva a la pérdida del potencial mitocondrial, la generación de especies oxidantes y la liberación de proteínas apoptogénicas [Perl *et al.* 2005]. Entre estas últimas se encuentra el citocromo c, componente de la cadena respiratoria y a la vez, una

de las más poderosas señales pro-apoptóticas. Una vez en el citoplasma, el citocromo c forma un complejo con otras proteínas, denominado apoptosoma. Éste tiene la propiedad de activar a una familia de proteasas, las caspasas, que son las encargadas de desencadenar la apoptosis subsecuente.

### **1.3. Acoplamiento físico y funcional entre RE y mitocondria**

---

RE y mitocondria son organelos que poseen una rica maquinaria transduccional que les permite la generación, amplificación y confinamiento de señales. Sin embargo, no se tratan de centros transduccionales aislados; al contrario, RE y mitocondria establecen contactos físicos que permiten el intercambio de mensajeros, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos [Rowland & Voeltz, 2012]. Estas regiones de contacto, denominadas membranas del RE asociadas a mitocondria (MAM, *mitochondria-associated ER membranes*), poseen una composición variable, susceptible a remodelado por proteínas de compartimentalización, como PACS2 [Myhill y cols., 2008] o Rab32 [Bui y cols., 2010].

El primer determinante de los contactos entre RE y mitocondria es la distribución de ambos en el espacio intracelular, regulando la distancia entre sus superficies. Este parámetro está dado por el movimiento organelar a lo largo de microtúbulos [Varadi *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2011]. Estudios al respecto han comprobado que ambos compartimentos presentan una mayor

confluencia cuando están ubicados en la región perinuclear, alrededor del centrosoma, mientras que en la región más periférica su agrupamiento es menor [Darios *et al.*, 2005]. Sin embargo, la expresión de la proteína dinamitina, encargada del movimiento retrógrado de la mitocondria, la desplaza hacia la región perinuclear, aunque sin aumentar su capacidad de captar  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente del RE [Varadi *et al.*, 2004]. Esta evidencia implica que la sola proximidad no es condición suficiente para favorecer el intercambio de  $\text{Ca}^{2+}$  entre RE y mitocondria.

Respecto a la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , el RE está constantemente acumulando el  $\text{Ca}^{2+}$  en su lumen, a través de la bomba ATPasa SERCA, para luego dejarlo salir controladamente por canales específicos, el receptor de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) y el receptor de rianodina (RYR) [Kaufman & Malhotra, 2014]. De esta forma, ante un estímulo, el  $\text{Ca}^{2+}$  logra ingresar rápidamente al citoplasma, aumentando su concentración unas 10 veces, activa sus procesos diana, y luego es recaptado por el mismo RE vía SERCA (Figura 1B). Por su parte, el potencial de membrana de la mitocondria, negativo respecto al citoplasma, genera una fuerza motriz suficiente para ingresar el catión a la matriz mitocondrial, modulando las señales generadas por el RE [Kaufman & Malhotra, 2014]. De esta forma, actúan como amortiguadores de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , evitando la dispersión de las señales por el espacio, o su prolongación excesiva en el tiempo. Esta función se logra gracias a dos propiedades que están

constantemente siendo moduladas: la continuidad luminal de la red mitocondrial, y su distribución dentro del espacio intracelular. Por un lado, en una red mitocondrial más fragmentada, hay un menor ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$ , producto del bloqueo en la difusión del ión en el espacio intraorganelar [Szabadkai *et al.*, 2004]. Por otro lado, aquellas mitocondrias ubicadas en la periferia celular interactúan preferentemente con la membrana plasmática, favoreciendo la captación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular, mientras que aquellas en la región perinuclear son las que tienen mayor número de contactos con el RE [Varadi *et al.*, 2004].

En cuanto al acoplamiento funcional que permite el traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$ , los canales que realizan este proceso,  $\text{IP}_3\text{R}$  en el RE, y  $\text{VDAC1}$  en la mitocondria, se encuentran formando un complejo con la chaperona  $\text{grp75}$  [Szabadkai *et al.*, 2006]. La presencia de esta proteína citoplasmática facilita el intercambio iónico, favoreciendo la interacción entre los canales, estructurándose así dominios especializados de señalización (“*hot spots*”). Estos microdominios de alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la superficie mitocondrial modulan la actividad de ésta a distintos niveles: favorecen la generación de ATP por estimulación metabólica [Cárdenas *et al.*, 2010], conducen a la fragmentación de la red mitocondrial [Szabadkai *et al.*, 2004], disminuyen su motilidad a lo largo de los microtúbulos [Yi *et al.*, 2004] o provocan la apertura del MPTP y así, a la disfunción mitocondrial y a la apoptosis [Hajnóczky *et al.*, 2003].

Durante el estrés de RE, todos los mecanismos anteriormente mencionados se orquestan secuencialmente, para así dar forma al destino celular. Desde un punto de vista energético, el estrés de RE aumenta los requerimientos de ATP celulares, pues es necesario para la actividad de las chaperonas y bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como medida adaptativa, durante las primeras etapas del estrés de RE, las mitocondrias se desplazan por los microtúbulos a la región perinuclear, donde establecen contactos con el RE [Bravo *et al.*, 2011]. Esto aumenta la eficiencia de la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre RE y mitocondria, estimulando así la bioenergética mitocondrial. El concomitante incremento en la producción de ATP permite la adaptación al estrés y la supervivencia celular. Por otro lado, en caso que la condición de estrés no se vea aliviada, la misma cercanía RE-mitocondria provoca sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial [Csordás *et al.*, 2006]. Este proceso se acompaña por fragmentación mitocondrial, la cual, al reducir la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  por la red, potenciaría aún más la disfunción mitocondrial, llevando a apertura del MPTP y finalmente apoptosis [Hom *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2011].

Este comportamiento dual de los contactos RE-mitocondria, los convierte en un arma de doble filo para la decisión de vida y muerte celular. Sin embargo, las rutas de señalización que regulan su formación durante condiciones de estrés, aún no están caracterizadas.

## 1.4. Proteína quinasa A: regulador de la dinámica organelar

---

Como ya se ha mencionado, la función de los organelos está fuertemente influenciada por variaciones en su comportamiento dinámico. La red mitocondrial, en particular, es conocida por experimentar profundos cambios morfológicos de acuerdo a la condición celular, variando entre estados de alta conectividad y estados de mayor fragmentación [Liesa *et al.*, 2009]. Mecánicamente, la fisión mitocondrial se logra gracias a DRP1, una GTPasa pequeña que media la constricción de membranas, generando dos mitocondrias más pequeñas a partir de una inicial. En tanto, el proceso de fusión es ejecutado por proteínas conocidas como mitofusinas y OPA1, que anclan entre sí las membranas externas e internas de dos mitocondrias individuales, respectivamente, a través de interacción homotípica (Figura 2). Estos controladores de la morfología mitocondrial tienen un gran impacto sobre el destino celular, dando forma a las respuestas tanto de tipo metabólico como apoptótico [Liesa y cols., 2009]. Más aún, Mitofusina-2 (Mfn2) se encuentra también en la superficie del RE, permitiendo el anclaje RE-mitocondria en las MAM, favoreciendo así la transferencia de  $Ca^{2+}$  [de Brito y Scorrano, 2008].

Dada esta similitud existente entre la morfología mitocondrial y los contactos entre organelos, la regulación de ambos procesos se realiza por mecanismos comunes. La proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), por ejemplo, realiza una fosforilación inhibitoria sobre DRP1, favoreciendo así el

estado fusionado de la red mitocondrial [Chang & Blackstone, 2007; Cribbs & Stack, 2009]. Por otro lado, PKA también regula a Mfn2 por fosforilación, teniendo efectos no tanto morfológicos, sino más bien inhibiendo su actividad anti-proliferativa [Zhou *et al.*, 2010].

En lo que respecta a condiciones de estrés, se ha descrito que la inhibición de mTOR, que corresponde a un estrés de tipo metabólico, induce la activación de PKA y así la fusión mitocondrial, estimulando la producción de ATP [Gomes *et al.*, 2011]. De manera similar, durante el estrés de RE la activación de PKA favorece la viabilidad celular [Takano *et al.*, 2007]. Sin embargo, el mecanismo molecular responsable de estas acciones se desconoce.

Una arista muy importante en la señalización por PKA es su compartimentalización, ya que su distribución intracelular puede ser controlada por proteínas de anclaje, conocidas como AKAPs (*A-kinase anchoring proteins*) [Felicciello *et al.*, 2005]. De este modo, ciertas isoformas de PKA se concentran en zonas transduccionales estratégicas, entre ellas la mitocondria. En ese sentido, una AKAP importante es la GTPasa pequeña Rab32, pues actúa como *switch* no sólo para el reclutamiento de PKA a la mitocondria, sino también para el control de la composición de la MAM [Bui *et al.*, 2010]. Este grado de compartimentalización, al parecer, cumple un rol regulatorio bastante fino, pues

permite una modulación de la morfología mitocondrial en forma independiente de su distribución subcelular.

Teniendo en consideración lo anteriormente expuesto, la presente tesis propone a PKA como un regulador positivo del acoplamiento RE-mitocondria, estimulando así la bioenergética mitocondrial durante el estrés de RE.

### **1.5. Caveolina-1 y dominios de señalización**

---

Debido a su importancia en la arquitectura subcelular, las MAM no sólo están enriquecidas en proteínas estructurales, sino que también presentan una composición lipídica particular. Sus niveles de colesterol y ceramidas son especialmente altos, formando microdominios con un relativamente alto nivel de empaquetamiento [Hayashi *et al.*, 2010]. Estas especies de balsas lipídicas ("*lipid rafts*") determinan en cierto grado la composición proteica de la MAM, a pesar de no ser necesarias para la formación de los contactos RE-mitocondria.

Caveolina-1 (Cav1) es una proteína conocida por participar en microdominios ricos en colesterol en la membrana plasmática, denominados caveolas [Quest *et al.*, 2008]. Éstas corresponden a invaginaciones de la membrana, que sirven de plataforma para la compartimentalización de proteínas especializadas en señalización. De este modo, Cav1 regula la transducción de señales provenientes del medio extracelular, al dar una localización privilegiada a moléculas receptoras, adaptadoras y mensajeras. A

destacar, esta capacidad de andamiaje no sólo puede favorecer la transducción de señales, sino que también puede tener carácter inhibitorio. En su camino a la membrana plasmática, Cav1 transita por el RE, ubicándose en dominios ricos en colesterol, donde controla la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  [Dremina *et al.*, 2006]. Gracias a esta capacidad para unir colesterol y sus proteínas asociadas, Cav1 además regula el flujo de colesterol desde las membranas del RE hasta su enriquecimiento en la membrana plasmática [Gu *et al.*, 2014].

En cuanto a la regulación mitocondrial, células tumorales deficientes en Cav1, son más susceptibles a la disfunción mitocondrial que las células tumorales silvestres, debido a una excesiva producción de especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) [Pavrides *et al.*, 2010]. Esta protección conferida por Cav1 se debe a que disminuye la transferencia de colesterol entre RE y mitocondria [Bosch *et al.*, 2011]. De este modo, Cav1 se erige como un potencial regulador negativo de la formación de contactos entre organelos.

Esta acción de Cav1 sobre el metabolismo mitocondrial podría estar relacionada directamente con la regulación tumoral. Las células tumorales frecuentemente “apagan” la actividad mitocondrial, incluso en presencia de oxígeno, evitando así el estrés oxidativo [Warburg, 1956]. Este mecanismo de supervivencia tumoral es conocido como "efecto Warburg", que favorece a la glicólisis y fermentación láctica como fuentes de energía. Más recientemente, se

ha descrito que algunas células, dentro del mismo tumor, desarrollan un “efecto Warburg inverso”, descansando primariamente en la mitocondria para generar ATP [Sotgia *et al.*, 2011]. Este proceso les permitiría ser más eficientes energéticamente, aumentar su inestabilidad genética por generación de ROS, y nutrirse del lactato producido por las células vecinas. La simbiosis de ambas estrategias complementarias aseguraría la generación y crecimiento tumoral. Cav1, al limitar la actividad mitocondrial, actuaría evitando el efecto Warburg inverso, y de esta forma, mantendría la estabilidad genómica, disminuyendo la generación de tumores. Por el contrario, la pérdida de expresión de Cav1 se asocia con un aumento en la tumorigénesis [Bender *et al.*, 2000], posiblemente, entre otros mecanismos, a su efecto sobre el metabolismo mitocondrial.

Por otro lado, también se ha determinado que Cav1 interactúa directamente con PKA [Razani & Lisanti, 2001], determinando su localización intracelular y modulando su actividad [Razani *et al.*, 1999]. En células intestinales, por ejemplo, Cav1 es necesaria para la actividad de PKA estimulada río abajo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos [El-Yazbi *et al.*, 2006]. Por otro lado, el metabolismo de lípidos ha mostrado depender de la interacción PKA-Cav1 en tejido adiposo [Cohen *et al.*, 2006]. Adipocitos deficientes en Cav1 presentan una actividad aumentada de PKA; sin embargo, la lipólisis en estas células, que es un proceso dependiente de PKA, se encuentra disminuido. Esta observación se debe a que Cav1 estructura microdominios en la superficie

de las gotas de lípidos, permitiendo una actividad localizada de PKA [Cohen *et al.*, 2006].

En vista de los antecedentes expuestos, la presente tesis propone a PKA como un regulador positivo de la formación de los contactos RE-mitocondria, mientras que Cav1 cumple un rol antagónico, modulando la localización de su actividad en las células tumorales.

## **2. HIPÓTESIS**

La activación de PKA estimula la formación de los contactos RE-mitocondria en la línea tumoral HeLa, la cual es antagonizada por Caveolina-1

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivos específicos**

---

#### **1) Determinar si PKA se activa en respuesta al estrés de RE**

Primeramente, se estudió si PKA se activa en respuesta a tunicamicina, y si esta activación es responsable de cambios relevantes en la fisiología mitocondrial.

#### **2) Estudiar el papel de PKA en el aumento de contactos RE-mitocondria**

Posteriormente, se estudió si la activación de PKA incrementa los contactos RE-mitocondria y la bioenergética mitocondrial ante estrés de RE.

#### **3) Investigar si caveolina-1 compartimentaliza e inhibe a PKA**

Finalmente, se analizó el papel de caveolina-1 en la formación de contactos RE-mitocondria. Se estudió la regulación que ejerce caveolina-1 sobre la distribución subcelular de la acción de PKA, el acoplamiento RE-mitocondria y las consecuencias funcionales de este acoplamiento.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos, anticuerpos y sondas

---

Todos los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania), a no ser que se especifique lo contrario. El medio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle medium*, DMEM, código: D1152) se adquirió de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EEUU), así como carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), rapamicina, histamina, Triton X-100 y anticuerpo anti  $\beta$ -actina. La solución de tripsina/EDTA y el suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS) se obtuvieron de GIBCO BRL (Carlsbad, CA, EEUU). De Invitrogen (Eugene, OR, EEUU) se adquirieron: Lipofectamine 2000, MitoTracker Green, ERTracker Red, OptiMEM, higromicina y los anticuerpos secundarios conjugados a sondas fluorescentes Alexa. La tunicamicina se obtuvo de Enzo Life Sciences (Farmingdale, New York, EEUU). El cóctel inhibidor de proteasas se obtuvo de Roche (Basel, Suiza). El anticuerpo contra la forma fosforilada de DRP1 (p-DRP1) se obtuvo de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EEUU). Los anticuerpos contra JNK y JNK fosforilado (p-JNK) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU). En BD Transduction Laboratories (San Jose, CA, EEUU) se adquirió el anticuerpo anti DRP1 total y en BD Biosciences Pharmigen (San Diego, CA, EEUU) se adquirió el kit de detección de muerte

celular por Anexina V. El anticuerpo anti mtHsp70 se adquirió en ABR–Affinity Bioreagents (Glosen, CO, EEUU). Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). El reactivo quimioluminiscente para Western blot. ECL se adquirió en Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). El medio de montaje para fluorescencia se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EEUU).

## **4.2. Cultivo celular**

---

Para los experimentos, se utilizaron células HeLa provenientes de ATCC entre los pasajes 10 y 30. Éstas se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% FBS en un incubador a 37°C y atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. La manipulación de las células se realizó en una campana de flujo laminar. Las células se sembraron en placas de 10 cm para permitir su proliferación. Al alcanzar una confluencia entre 90%, las células se desprendieron de la placa para su posterior utilización. Para ello, el medio de cultivo se removió por aspiración y la placa se lavó dos veces con 1 mL de tampón fosfato salino (*phosphate-buffered saline*, PBS). Luego, la placa se trató con 1 mL de solución de tripsina/EDTA entre 5 y 10 min a 37°C. La tripsinización se detuvo añadiendo 5 mL de medio fresco. Distintas porciones de la suspensión celular se sembraron en nuevas placas, de acuerdo al experimento, y otra porción se

sembró nuevamente a baja confluencia en placa de 10 cm, para continuar con la proliferación celular.

### **4.3. Transfección transitoria**

---

Las células se sembraron a una confluencia del 60%. Luego, el medio de cultivo se reemplazó por OptiMEM y así se mantuvieron por 2 h. Posteriormente, a cada pocillo se le agregó una mezcla de 1 µg de plasmidio y 2 µL de Lipofectamine 2000®, en OptiMEM, preparada 20 min antes de su uso. Luego de 5 h, el medio se reemplazó por medio de cultivo fresco y las células se dejaron por 24 h para permitir la expresión proteica.

Para incrementar artificialmente los contactos RE-mitocondria, las células se transfectaron transitoriamente con plasmidios de expresión de una construcción control (RFP con una secuencia de destinación a OMM) o una construcción linker (RFP con secuencias de destinación a OMM y a la superficie del RE simultáneamente) [Csordás *et al.*, 2006]. Ambos plasmidios fueron gentilmente donados por el Dr. György Hajnócsky de la Thomas Jefferson University, EEUU.

### **4.4. Transfección estable**

---

Las células HeLa se transfectaron como se indica en el punto anterior con el vector de expresión pLacIOP ya sea vacío (*Mock*) o portando el cDNA de Caveolina-1 (Cav1) [Bender *et al.*, 2000]. Para mantener el plasmidio en forma

estable, cada 3 semanas las células se seleccionaron con higromicina 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 10 días. Previo a la experimentación, las células se trataron con IPTG 1 mM por 24 h, de modo que las células HeLa (Cav1) sobreexpresen caveolina-1. Las células HeLa (Mock) se expusieron a iguales condiciones, ya que sirven como control.

#### **4.5. Muestras para microscopía de inmunofluorescencia**

---

Las células HeLa se sembraron en placas de 12 pocillos con cubreobjetos de 0,17 mm de grosor, a una confluencia del 30%. Tras de someterlas a las condiciones experimentales deseadas, las células se lavaron 2 veces con PBS a 4°C, se fijaron con PBS 4% paraformaldehído por 20 min y se permeabilizaron con PBS 0,1% Tritón X-100 por 10 min. Posteriormente, las células se bloquearon con PBS 1% BSA durante 1 h y luego se incubaron con anticuerpos primarios también en PBS 1% BSA por toda la noche a 4°C. Se lavaron 2 veces con PBS y luego se incubaron por 2 h a temperatura ambiente, y protegidas de la luz, con los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa 488 y 568 (dilución 1:5000). Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando medio de montaje DAKO.

#### **4.6. Muestras para microscopía confocal en células vivas**

---

Las células HeLa se sembraron en placas de 6 pocillos con cubreobjetos de 0,17 mm de grosor, usando una confluencia del 30%. Tras de someterlas a

las condiciones experimentales deseadas, el medio de cultivo se reemplazó por medio Krebs que contenía las sondas fluorescentes. Las sondas se incubaron con las células por 30 min a 37°C. Posteriormente, el cubreobjetos se ubicó en una cámara para microscopía y se lavó con medio Krebs dos veces. Las células se dejaron en la cámara con medio Krebs y luego se montaron en el microscopio. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Zeiss LSM-5, Pascal 5 Axiovert 200, con un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC, usando láseres de excitación de 488 y 543 nm. Por cada experimento independiente se promedió la señal de 5 a 15 células.

Para visualizar la red mitocondrial y el RE se utilizaron las sondas MitoTracker Green (200 nM) y ERTracker Red (1  $\mu$ M), respectivamente. Para la medición de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y mitocondrial se usaron las sondas Fluo-3-AM (4,4  $\mu$ M) y Rhod-FF-AM (5,5  $\mu$ M), respectivamente.

#### **4.7. Captura y procesamiento de imágenes**

---

El análisis de colocalización se realizó sobre 1 plano focal correspondiente al ecuador de las células. Para el análisis de objetos, se tomó un registro de la totalidad celular, esto corresponde a 10 planos focales en el eje z. Para ambos tipos de experimentos el tamaño de pixel fue de 68 nm, el óptimo de acuerdo con el sistema óptico utilizado y siguiendo el criterio de muestreo de Nyquist.

Las imágenes así obtenidas se desconvolucionaron, se les restó el ruido de fondo y se les aplicó un filtro de medianas, utilizando el programa ImageJ.

Para analizar las cinéticas de calcio, las imágenes se adquirieron a intervalos de 1 s. La fluorescencia basal se midió durante 50 s, luego de lo cual se añadió histamina (100 mM) para estimular la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios intracelulares. La señal resultante se midió durante 200 s. Para este experimento, el tamaño de pixel se incrementó a 900 nm, para favorecer la rapidez en la captura de imágenes.

El análisis radial de la distribución mitocondrial se realizó sobre 1 plano focal correspondiente al ecuador de las células, tal como se publicó anteriormente [Bravo *et al.*, 2011]. Primero, la distancia radial se relativizó respecto al tamaño de cada célula. Para ello, se estimó el radio celular (R), calculado (en  $\mu\text{m}$ ) a partir de la ecuación de la circunferencia  $A = \pi \cdot R^2$ , siendo A el área de cada célula (en  $\mu\text{m}^2$ ). De esta forma, cada célula se dividió en 4 anillos concéntricos, cuyo centro coincide con el centro del núcleo celular. Estas regiones se denominaron “Nuclear”, “Perinuclear”, “Medial” y “Radial”, y están dispuestos a intervalos de 0,3 R (Figura 11). Finalmente, para cada célula se cuantificó la intensidad de fluorescencia de Mitotracker green en cada una de las regiones radiales, normalizando a un 100 % el total de fluorescencia. La fluorescencia que queda fuera de estas 4 regiones también es medida y

considerada en los cálculos; sin embargo, al representar menos del 5 % del total, no se grafica ni se sometió a análisis estadístico.

#### **4.8. Microscopía electrónica**

---

Las células HeLa se sembraron en placas de 35 mm a una confluencia del 30%. Tras de someterlas a las condiciones experimentales deseadas, las células se lavaron y fijaron con  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,1 M pH 7,3 2,5% glutaraldehído. Posteriormente, las células se embebieron en una solución 2% agarosa y se post-fijaron con tetróxido de osmio al 1%, utilizando tinción de uranilo y deshidratación en soluciones seriadas de etanol. Posteriormente, las muestras se impregnaron en una resina Epon 812 y cortadas (<3 mm) en un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Wetzlar, Alemania) para ser visualizadas en un microscopio electrónico FEI Tecnai G2 Spirit (Hillsboro, OR, EEUU) con una fuente LaB6 a 120 kV. Estos experimentos se llevaron a cabo en la Electron Microscopy Facility, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA con la colaboración de la Dra. Valentina Parra.

#### **4.9. Oxigrafía**

---

Las células HeLa se sembraron en placas de 60 mm a una confluencia del 80%. Tras someterlas a las condiciones experimentales deseadas, el medio de cultivo se removió por aspiración y los pocillos se lavaron dos veces con 1 mL de PBS. Luego, las placas se trataron con 1 mL de tripsina y se incubaron por

5-10 min a 37°C. La tripsinización se detuvo con 100 µL de FBS y las células resuspendidas se centrifugaron a 200xg por 5 min. Después de descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en PBS. La suspensión se colocó en una cámara de respirometría a 25°C, acoplada a un electrodo de Clark (Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Escocia). Los datos obtenidos correspondieron a la cantidad de oxígeno remanente en la cámara a lo largo del tiempo. Para determinar la respiración mitocondrial desacoplada, se añadió CCCP a una concentración final de 200 nM. La velocidad con que las células consumían el oxígeno de la cámara se cuantificó por intervalos de 5 min tanto en condición basal como en presencia de CCCP.

#### **4.10. Extracción de proteínas totales**

---

Las células HeLa se sembraron en placas de 60 mm a una confluencia del 80%. Tras someterlas a las condiciones experimentales deseadas, las placas se lavaron 3 veces con PBS frío, y se lisaron con 100 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5mM; NaCl 50 mM; NP40 0,5% v/v; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). Los homogeneizados se centrifugaron a 8.000xg por 10 min. Los sobrenadantes se rescataron y la concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU). Los extractos de

proteínas se desnaturaron en tampón de carga para SDS-PAGE por 5 min a 100°C, y las muestras posteriormente se almacenaron a –80°C.

## **4.11. Fraccionamiento subcelular**

---

### **Fraccionamiento simple**

Las células HeLa se sembraron en placas de 10 cm a una confluencia del 90%. Tras someterlas a las condiciones experimentales deseadas, las placas se lavaron 2 veces con PBS frío, y se rasparon con 600  $\mu$ L de tampón de homogeneización (HEPES 10 mM pH 7,6; EDTA 1 mM; sacarosa 250 mM; cóctel Inhibidor de proteasas 1x). Las células se homogeneizaron pasando la solución 10 veces ida y vuelta a través de un homogeneizador de rodamiento de bolas (Isobiotec, Heidelberg, Alemania), con 18  $\mu$ m de apertura. Los homogeneizados se centrifugaron a 800xg por 10 min a 4°C para eliminar núcleos y células no rotas. Los sobrenadantes se rescataron y centrifugaron por 10 min a 10.000xg a 4°C. Los sedimentos resultantes, correspondientes a las membranas pesadas, se reservaron. Los sobrenadantes se rescataron y centrifugaron por 1 h a 100.000xg a 4°C. Los sedimentos resultantes, correspondientes a las membranas livianas, se reservaron. Los sobrenadantes se precipitaron toda la noche en acetona al 70%, y luego secados. Esta última fracción corresponde al citosol. Todas las fracciones se resuspendieron en tampón de carga para SDS-PAGE por 5 min a 100°C, y almacenaron a –80°C.

## **Purificación de MAM**

Las células HeLa se sembraron en 15 placas de 20 cm a una confluencia del 90% por cada condición. Tras someterlas a las condiciones experimentales deseadas, las placas se lavaron 2 veces con PBS frío, y se rasparon con 4 mL de tampón de homogeneización (HEPES 10 mM pH 7,6; EDTA 1 mM; sacarosa 250 mM; cóctel inhibidor de proteasas 1x). Las células se homogeneizaron pasando la solución 10 veces ida y vuelta a través de un homogeneizador de rodamiento de bolas (Isobiotec, Heidelberg, Alemania), con 18  $\mu$ m de apertura. Los homogeneizados se centrifugaron a 600xg por 10 min a 4°C para eliminar núcleos y células no rotas. Los sobrenadantes se rescataron y centrifugaron por 10 min a 10.000xg a 4°C. Los sedimentos resultantes, correspondientes a las membranas pesadas, se reservaron. Los sobrenadantes se rescataron y centrifugaron por 1 h a 100.000xg a 4°C. Los sedimentos resultantes, correspondientes a las membranas livianas, se reservaron, al igual que los sobrenadantes, correspondientes a las fracciones citosólicas. Los sedimentos de las membranas pesadas se resuspendieron en 1 mL de tampón de homogeneización y dispuestos sobre 7,9 mL de tampón de homogeneización 18% Percoll. Dichas preparaciones se centrifugaron por 1 h a 100.000xg a 4°C en un rotor 90Ti (Beckman Coulter, Pasadena, CA, EEUU). De las gradientes resultantes se rescataron 2 bandas visibles: las superiores, correspondientes a las MAM, y las inferiores, correspondientes a las mitocondrias. Todas las

fracciones en solución se precipitaron toda la noche en acetona al 70%, y luego secados. Todas las fracciones se resuspendieron en tampón de carga para SDS-PAGE por 5 min a 100°C, y almacenaron a -80°C.

#### **4.12. Inmunolectrotransferencia (Western blot)**

---

La separación de proteínas obtenidas se realizó en condiciones desnaturalantes en geles de 10% poliacrilamida, en presencia de docecilsulfato de sodio (*Sodium Docecyl Sulfate*, SDS). Una vez realizada la electroforesis por 1 h a 100 mV, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0,2  $\mu\text{m}$  durante 90 min a 0,45 A en tampón de transferencia con metanol 20%. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo consistente en leche descremada al 5% en solución salina de TBS-Tween-20 (0,01% v/v) (TTBS). Luego las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos correspondientes. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces por 15 min con TTBS y luego se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG conjugado a peroxidasa, disuelto en la misma solución de bloqueo. Al término de la incubación, las membranas se lavaron exhaustivamente y se detectaron las proteínas por un método quimioluminiscente (ECL). La intensidad de las bandas resultantes se determinó por densitometría.

### **4.13. Viabilidad celular**

---

#### **Citometría de flujo**

Las células HeLa se sembraron en placas de 12 pocillos a una confluencia del 60%. Tras de someterlas a las condiciones experimentales deseadas, las células se lavaron 2 veces con PBS e incubaron por 30 min en PBS con Anexina V. Luego se procedió a una tripsinización por 5 min con 300  $\mu$ L de solución tripsina/EDTA, la cual se detuvo añadiendo FBS a una concentración final del 10%. Finalmente, las células se colectaron en un tubo y su nivel de fluorescencia se midió con un citómetro FACS Canto II, BD Biosciences (San Diego, CA, EEUU).

### **4.14. Análisis estadístico**

---

Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  error estándar (*standard error of the mean*, SEM). Se analizaron, al menos, tres muestras tratadas en condiciones experimentales independientes. Para los cálculos estadísticos se utilizó el programa Graphpad Prism 6, considerándose como diferencia significativa un valor  $p < 0,05$ .

Para los experimentos en que sólo se analizaron dos condiciones (Ej. control y forskolina, Figura 10A), los datos se compararon mediante el test *t* de Student pareado de una cola, con la corrección de Welch.

El resto de los experimentos siempre se estratificaron según 2 factores: por un lado, la inducción de estrés de RE (presencia o ausencia de tunicamicina), y por otro lado, un segundo factor modificador (Ej. presencia o ausencia de H89, Figura 4A; células Mock o CAV1, Figura 12B; transfección con plasmidio-control o plasmidio linker, Figura 21). En estos casos, los datos se compararon mediante ANOVA de dos vías, pareado, seguido por un post-test de Bonferroni corregido para múltiples comparaciones.

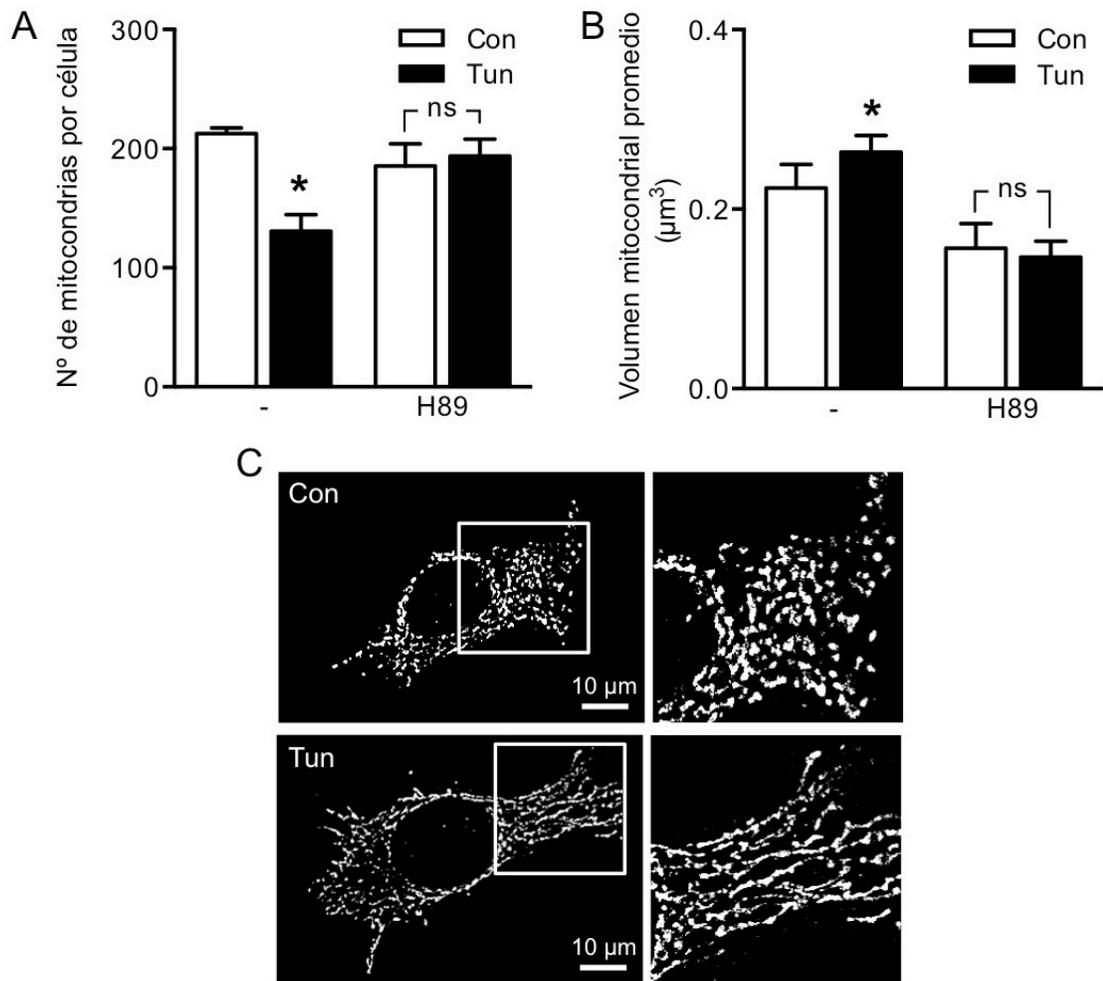
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Activación de PKA en la fase temprana del estrés de RE

---

Primeramente, se determinó la posible activación de PKA con efectos regulatorios sobre la dinámica organelar durante la fase temprana de estrés de RE. Para ello, se evaluaron los cambios en la morfología mitocondrial inducidos por tunicamicina 0,5  $\mu\text{g/mL}$  por 4 h (Tun) respecto a la condición control (Con), mediante reconstrucción 3D usando microscopía confocal. Como se esperaba, el estrés de RE produjo elongación mitocondrial (Figura 4C), la cual se aprecia como una disminución en el número de mitocondrias por célula (Figura 4A), las cuales aumentan en tamaño (Figura 4B). Estos cambios se previnieron en presencia del inhibidor H89 (10  $\mu\text{M}$ ), indicando que la actividad de PKA es responsable de estos cambios.

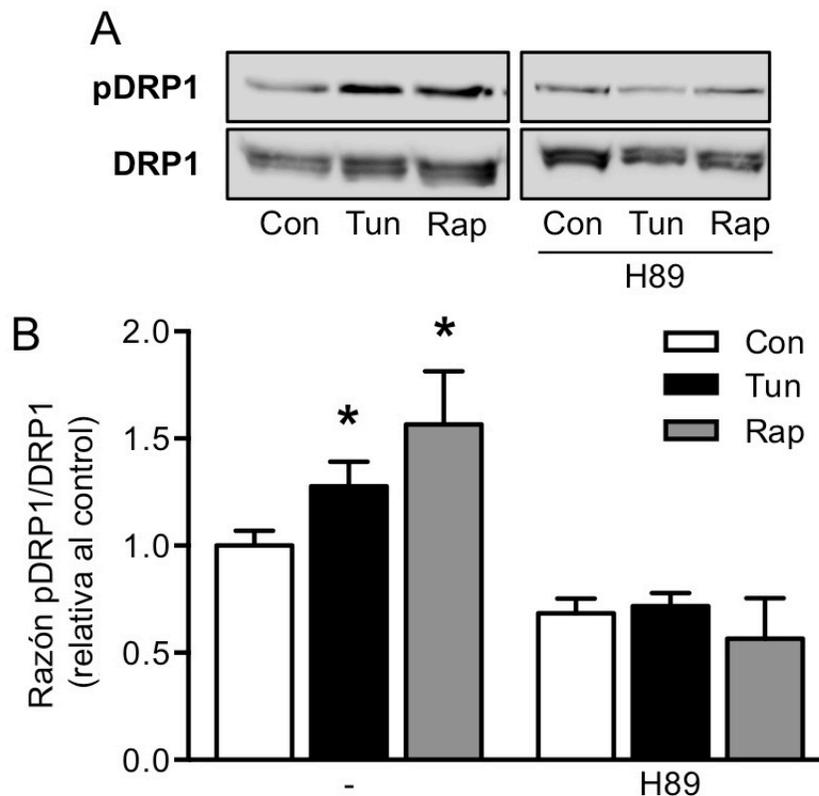
Como medida más directa de la activación de PKA, se midió la fosforilación de DRP1 en Ser637 (pDRP1) mediante Western blot. Esta fosforilación inhibitoria disminuye la actividad constrictora de DRP1, favoreciendo así el proceso contrario, de elongación mitocondrial. Efectivamente, los resultados mostraron que el estrés de RE aumentó esta fosforilación de DRP1 (Figura 5), la cual se previno por H89, indicando a PKA como responsable de estos cambios.



**Figura 4. Participación de PKA en la elongación mitocondrial durante la fase temprana del estrés de RE.**

(A) Número promedio de mitocondrias por célula, cuantificado en células HeLa control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun) en presencia o ausencia de H89, teñidas con Mitotracker Green y reconstruidas en 3D usando microscopía confocal. (B) Volumen mitocondrial promedio de las mismas muestras que en A. (C) Imágenes representativas de la red mitocondrial de células HeLa control o tratadas con tunicamicina. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. Por cada muestra independiente se analizaron entre 5 y 15 células. \*  $P \leq 0,05$  respecto al control, ns = no significativo. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

Como control positivo de la fosforilación de DRP1 en Ser637 por PKA, se recurrió a la inhibición de mTOR a través de rapamicina 100 nM por 4 h (Rap). Se ha mostrado que este tratamiento induce autofagia, condición donde PKA también se activa, aumentando la fusión mitocondrial para estimular el metabolismo [Gomes *et al.*, 2011]. En este caso, la fosforilación también se inhibió por H89, identificando a PKA como la quinasa responsable (Figura 5). De este modo, la activación de PKA parece ser una vía de señalización común en la regulación de organelos frente a condiciones de estrés.



**Figura 5. Fosforilación de DRP1 mediada por PKA en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) *Western blot* de DRP1 total y fosforilado en Ser637 en células HeLa control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun) o rapamicina (Rap), en presencia o

ausencia de H89. (B) Cuantificación de las muestras obtenidas en A. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0,05$  vs control, ns = no significativo

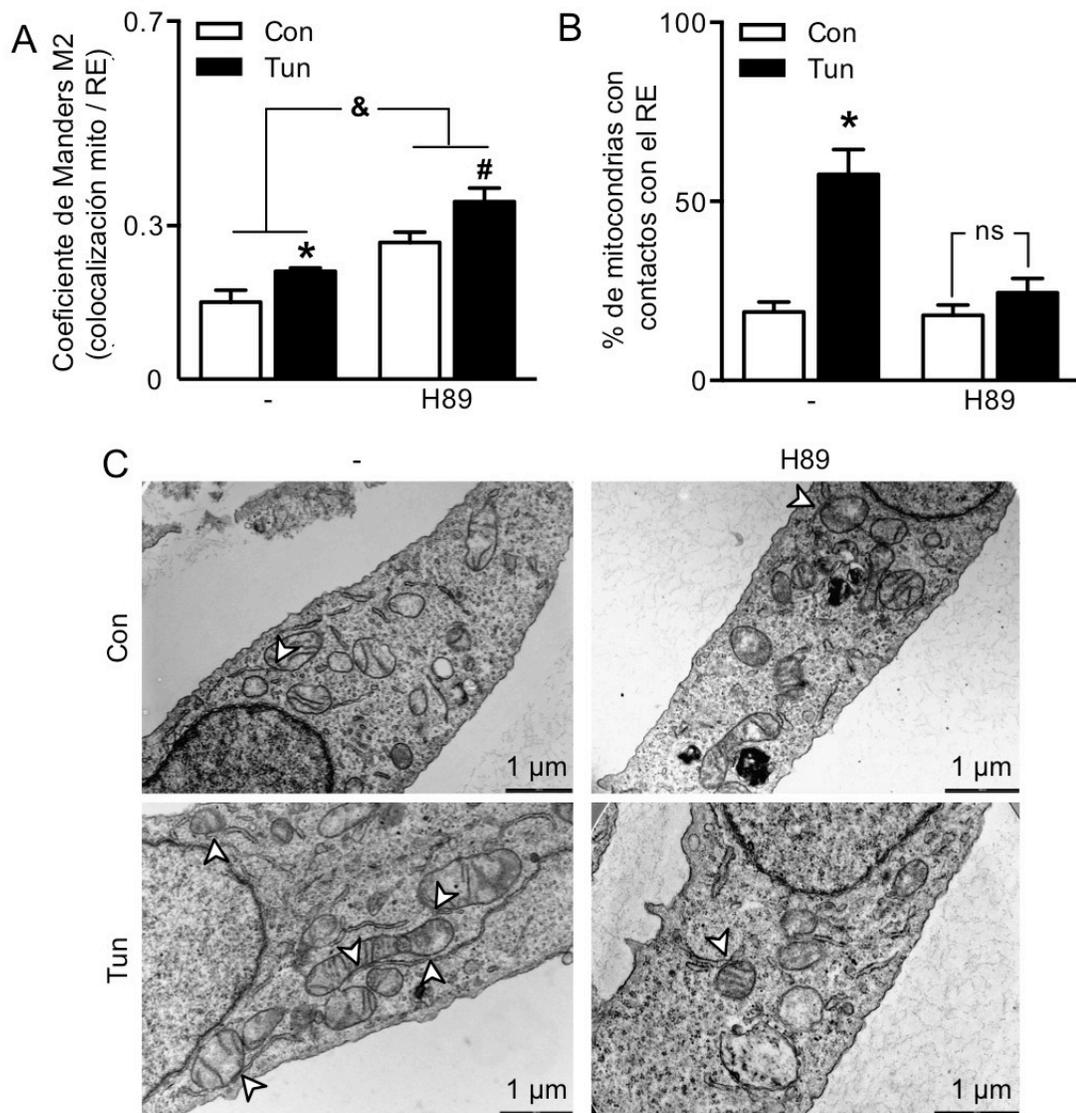
## **5.2. Activación de PKA aumenta los contactos RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE**

---

Ya establecida la activación de PKA durante la etapa temprana del estrés de RE, se analizó su papel en la formación de contactos físicos entre RE y mitocondria, usando el inhibidor H89.

Como primer ensayo, se midió la proximidad entre organelos mediante colocalización RE-mitocondria a través de microscopía confocal. Contrario a lo esperado, la inhibición de PKA *per se* incrementó la colocalización RE-mitocondria en forma basal, y ésta se incrementó aún más por estrés de RE (Figura 6A). Por el contrario, al medir los contactos mediante microscopía electrónica, se determinó que H89 inhibe la formación de contactos inducida por estrés de RE temprano (Figura 6B-C). Estos resultados, aparentemente contradictorios pueden explicarse a través de la resolución de ambas técnicas: mientras la microscopía confocal tiene una resolución de  $\sim 200$  nm, la de la microscopía electrónica es de  $\sim 1$  nm, lo cual es mucho más cercano al tamaño de los contactos RE-mitocondria ( $\sim 10$  nm). De esta forma, mediante microscopía electrónica efectivamente pueden cuantificar los contactos inter-organelares, mientras que la microscopía confocal es más bien indicativa de la

posición relativa entre RE y mitocondria, determinada por el movimiento organelar a gran escala. De esta forma, el aumento en la cercanía RE-mitocondria inducida por H89 observada por microscopía confocal no va acompañado de un aumento en los contactos entre ambos organelos, y podría ser más bien una respuesta compensatoria ante la pérdida de contactos físicos.

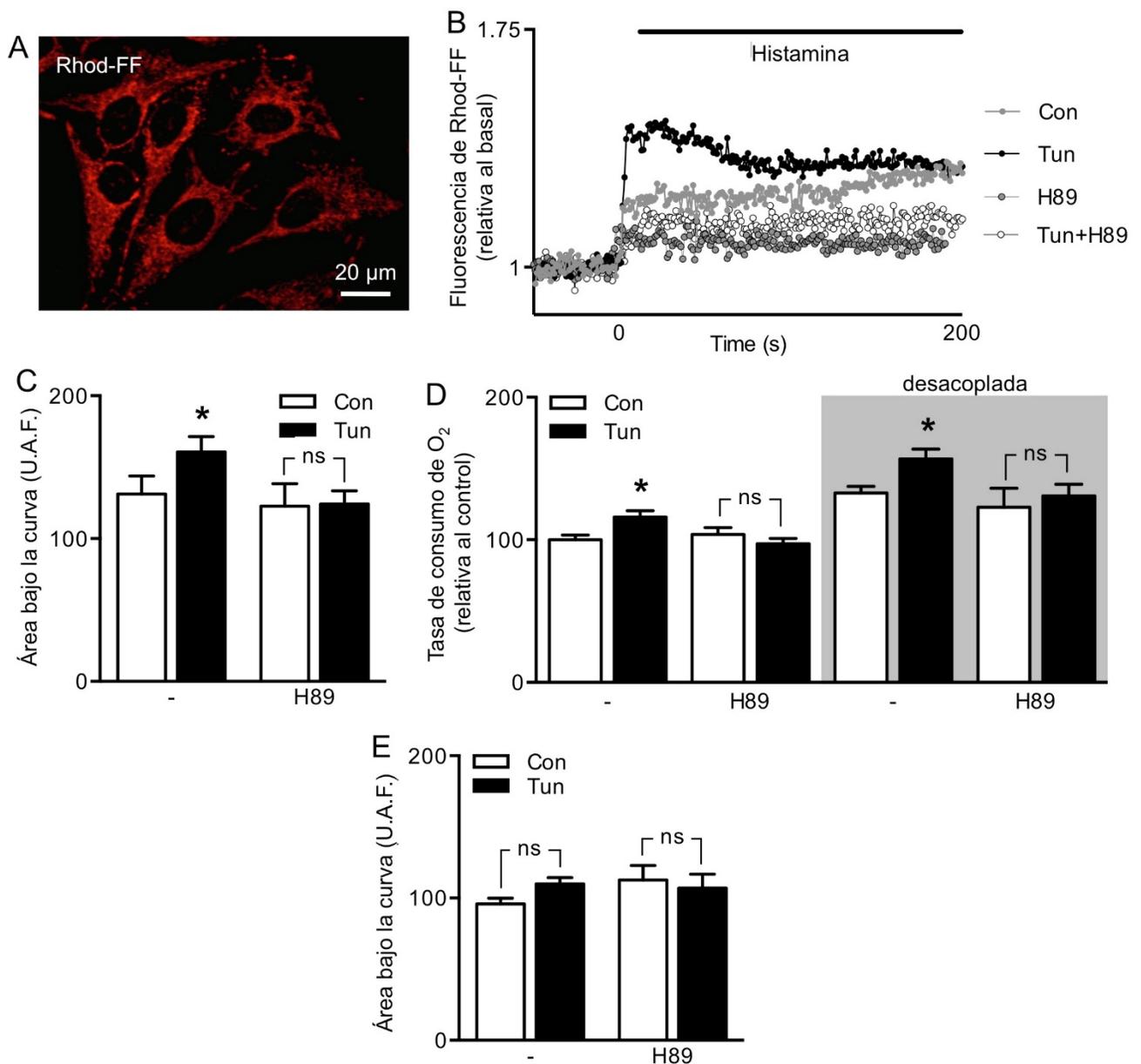


**Figura 6. Formación de contactos RE-mitocondria mediada por PKA en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) Coeficiente de colocalización de Manders entre RE y mitocondria de células HeLa control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun) en presencia o ausencia de H89. Los organelos fueron marcados con Mitotracker green y RFP recombinante destinada al RE. N = 3. Por cada muestra independiente se analizaron entre 5 y 15 células. \*  $P \leq 0,05$  respecto al control, #  $P \leq 0,05$  respecto a células tratadas con H89 solo. (B) Porcentaje de mitocondrias formando contactos con el RE en células HeLa control o tratadas con tunicamicina en presencia o ausencia de H89, medido por microscopía electrónica. N = 4. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. Por cada muestra se

analizaron alrededor de 50 mitocondrias. \*  $P \leq 0,05$  respecto al control, ns = no significativo. (C) Imágenes representativas de las muestras cuantificadas en B. Las flechas blancas indican contactos RE-mitocondria. Barra = 1  $\mu\text{m}$ .

Como una medida de la funcionalidad de estos contactos, se midió la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a la mitocondria. Mediante microscopía de fluorescencia, se determinaron los aumentos en el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial usando Rhod-FF, generados por histamina, un conocido inductor de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los  $\text{IP}_3\text{R}$  en el RE. Para controlar la especificidad de la marca con Rhod-FF, se muestra una imagen confocal de su distribución subcelular (Figura 7A), con un patrón correspondiente a la red mitocondrial. Como se esperaba de acuerdo a los resultados anteriores, el estrés de RE aumentó la eficiencia de traspaso de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a la mitocondria, lo cual fue inhibido por H89 (Figura 7B-C). De manera concordante, la respiración mitocondrial también se incrementó por el estrés de RE temprano, lo cual se previno por H89 (Figura 7D). Estos datos se asemejan al trabajo previo de Bravo *et al.* (2011), en el cual se mostró que los contactos RE-mitocondria están directamente relacionados con la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre organelos y el metabolismo energético mitocondrial. La inhibición de estos parámetros por H89 indica que PKA es un regulador positivo de esta respuesta adaptativa.



**Figura 7. PKA aumenta la comunicación RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) Imagen representativa de células HeLa cargadas con Rhod-FF mostrando su compartimentalización mitocondrial. Imagen obtenida mediante microscopía confocal. (B) Señal representativa de  $Ca^{2+}$  mitocondrial producida por estimulación con histamina en células HeLa control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun) en presencia o ausencia de H89, medido por microscopía de fluorescencia. (C) Área bajo la curva de gráficos obtenidos como en A. (D) Tasa de consumo de oxígeno basal y desacoplada medido en células HeLa control o

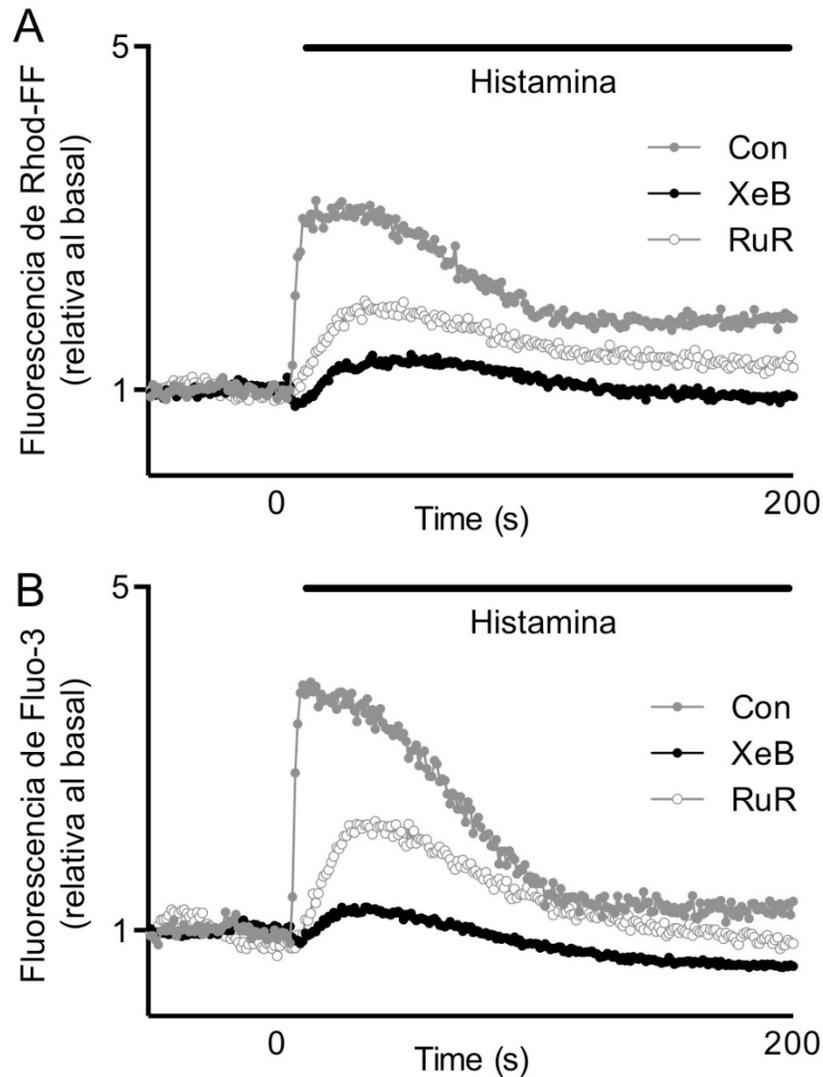
tratadas con tunicamicina en presencia o ausencia de H89 mediante electrodo de Clark. (E) Área bajo la curva de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico producidas por estimulación con histamina en células HeLa control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun) en presencia o ausencia de H89, medido por microscopía de fluorescencia. U.A.F. = unidades arbitrarias de fluorescencia. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . \*  $P \leq 0,05$  respecto al control, ns = no significativo.

Como control de que estas observaciones se deban específicamente a cambios en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, y no a cambios en los en la liberación total de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE, simultáneamente se midieron los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico usando la sonda Fluo-3-AM. Tal como se publicó anteriormente, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  total liberados desde el RE se mantuvieron sin cambios durante las condiciones experimentales (Figura 7E).

Además, tanto la señal mitocondrial como citosólica se abolieron por Xestospongina B (XeB), inhibidor específico del  $\text{IP}_3\text{R}$ . Ruthenium Red (RuR), inhibidor de la captación de calcio mitocondrial, también disminuyó importantemente la señal mitocondrial, afectando también la señal citosólica (Figura 8A-B).

Otros autores han mostrado que AMPK también puede fosforilar a DRP1 en Ser637 frente a estrés de RE en células  $\beta$  pancreáticas [Wikstrom *et al.*, 2013]. En nuestro modelo, el activador de AMPK, AICAR (250  $\mu\text{M}$ ) estimuló la respiración mitocondrial. Sin embargo, el uso conjunto de AICAR y tunicamicina no tuvo un efecto aditivo sobre el metabolismo mitocondrial (Figura 9A). Esto sugiere que tanto AMPK como PKA aumentarían el metabolismo mitocondrial a

través de mecanismos comunes, entre ellos posiblemente, la fosforilación de DRP1.

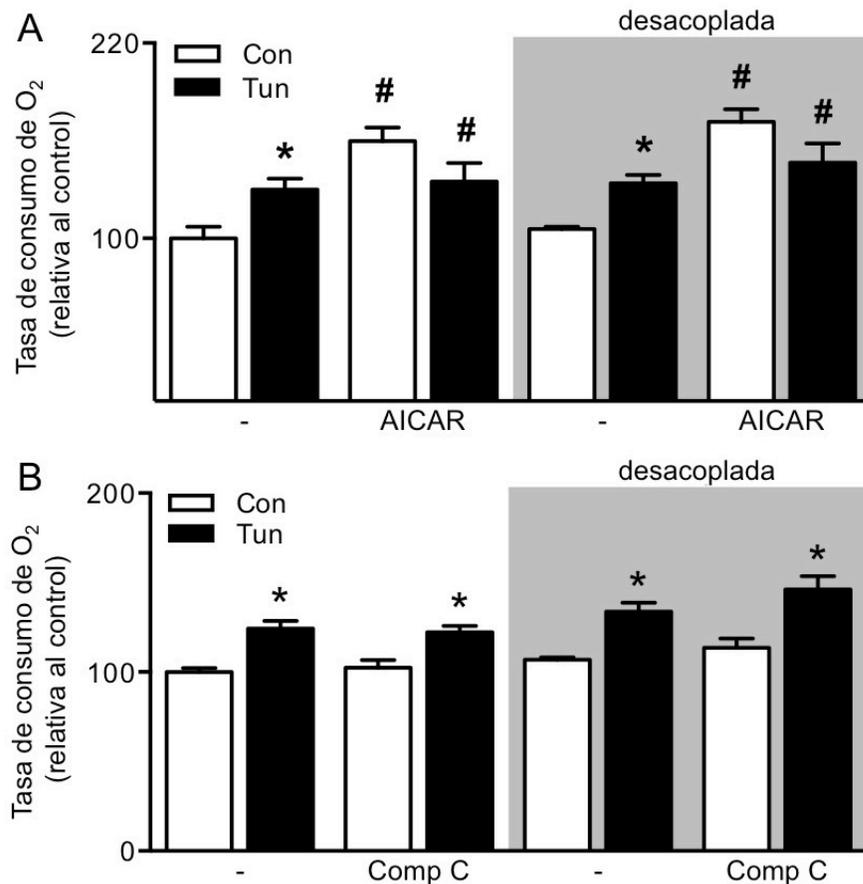


**Figura 8. Xestospongina B y Ruthenium Red disminuyen la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial inducidas por histamina.**

(A y B) Señales representativas de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y citosólico, producidas por estimulación con histamina en células HeLa control o tratadas con Xestospongina B o Ruthenium Red, medido por microscopía de fluorescencia.

Por otro lado, el inhibidor de AMPK, compuesto C (Comp C, 100 nM), no tuvo efecto sobre el incremento en la respiración mitocondrial inducido por

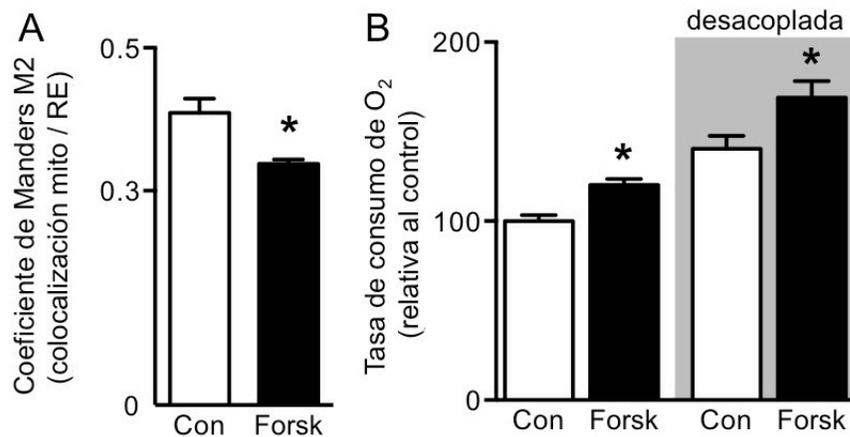
estrés de RE temprano (Figura 9B). Esta observación indica que, si bien ambas quinasas tendrían un mismo efecto sobre la bioenergética mitocondrial, AMPK no es una vía de señalización necesaria durante el estrés de RE temprano, como lo es PKA.



**Figura 9. AMPK no participa en la estimulación mitocondrial en la fase temprana del estrés de RE.**

(A y B) Tasa de consumo de oxígeno basal y desacoplada medido en células HeLa control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun) mediante electrodo de Clark en presencia o ausencia de AICAR o Compuesto C, respectivamente. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0,05$  respecto a condición sin tunicamicina, #  $P \leq 0,05$  respecto a condición control.

Para comprobar que PKA era responsable de estos cambios, se recurrió a forskolina (Forsk, 100  $\mu$ M), un inductor de la producción de cAMP a través de la adenilato ciclasa, y así, de la activación de PKA. El uso de forskolina, contrario a H89, redujo la cercanía RE-mitocondria, medida por colocalización en microscopía confocal (Figura 10A). Asimismo, forskolina incrementó la respiración mitocondrial, de manera similar a la condición de estrés de RE temprano (Figura 10B). Estas observaciones apoyan la noción de que PKA es responsable de la estimulación del metabolismo mitocondrial.



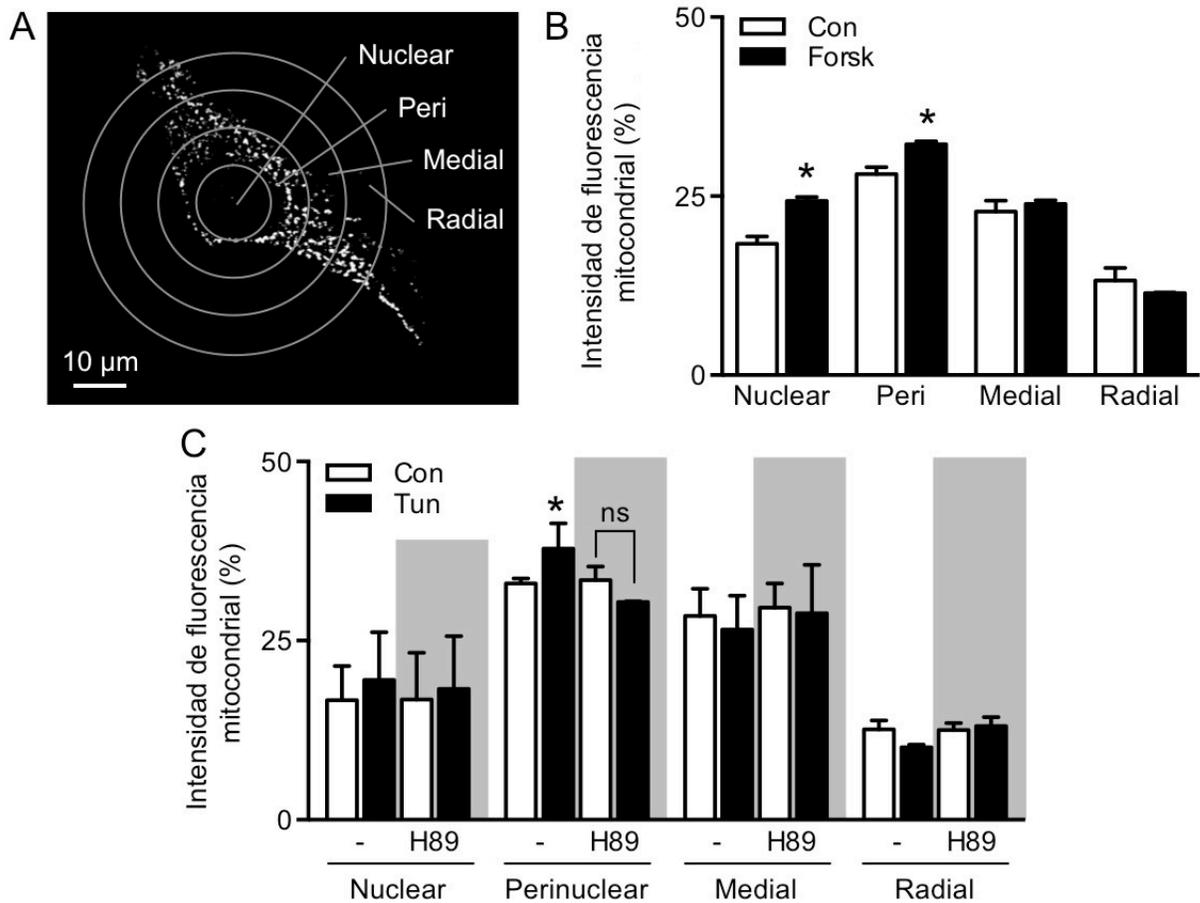
**Figura 10. Efecto de forskolina en la proximidad mitocondria-RE y consumo de oxígeno.**

(A) Coeficiente de colocalización de Manders entre RE y mitocondria de células HeLa control (Con) o tratadas con forskolina (Forsk). Los organelos se marcaron con Mitotracker green y RFP recombinante destinada al RE. N = 3. Por cada muestra independiente se analizaron entre 5 y 15 células. (B) Tasa de consumo de oxígeno basal y desacoplada en células HeLa control o tratadas con forskolina medido mediante electrodo de Clark. N = 4. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \* P  $\leq$  0,05 respecto a condición sin forskolina.

Para explorar el efecto de PKA sobre la proximidad general entre organelos, se estudió su efecto sobre la distribución mitocondrial. En un trabajo

previo, se mostró que durante estrés de RE temprano, la red mitocondrial se desplaza hacia la región perinuclear, en un movimiento dependiente de microtúbulos [Bravo *et al.*, 2011]. En el presente proyecto se determinó la distribución mitocondrial dividiendo la célula en 4 anillos concéntricos, en los cuales se midió la intensidad relativa de fluorescencia mitocondrial (Figura 11A). Forskolina, activador río arriba de la vía de PKA indujo una redistribución mitocondrial hacia regiones más centrales (Figura 11B). El estrés de RE temprano también indujo una redistribución mitocondrial, específicamente hacia la región perinuclear. La inhibición de PKA durante este proceso, por su parte, abolió esta redistribución, manteniendo una red mitocondrial similar al control (Figura 11C). Esto sugiere que PKA sería un regulador positivo del movimiento retrógrado mitocondrial, afectando así su localización global. Si PKA regula directamente el desplazamiento organelar, o se trata más bien de un mecanismo compensatorio, es algo que requiere mayor investigación.

De este conjunto de resultados, se puede concluir que durante el estrés de RE, la activación de PKA es necesaria para la formación de contactos RE-mitocondria, permitiendo así un incremento en la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre organelos, y la estimulación de la bioenergética mitocondrial. PKA parece también cumplir un papel en la distribución mitocondrial en el espacio celular durante la respuesta adaptativa al estrés de RE.

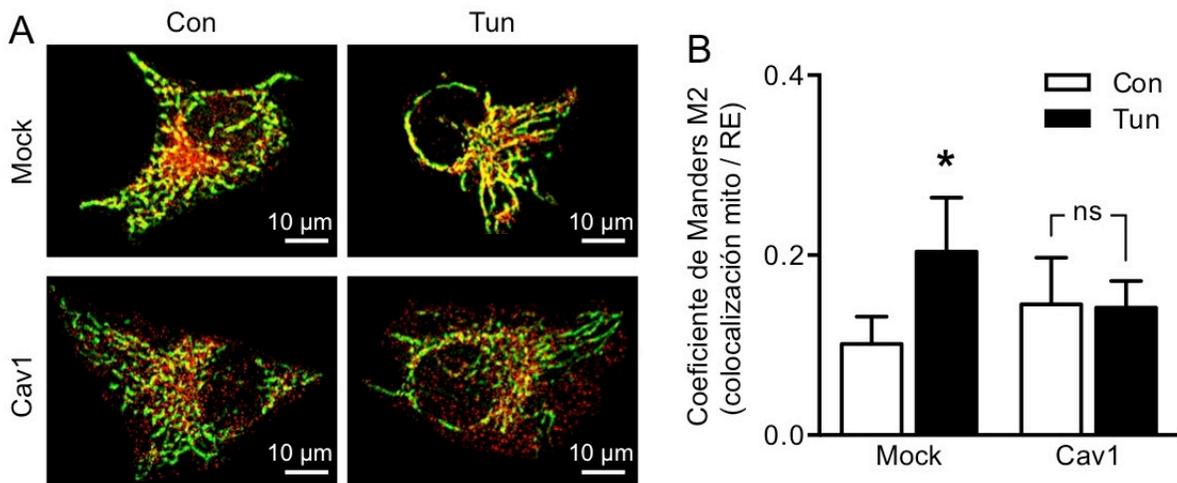


**Figura 11. PKA determina la distribución mitocondrial en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) Plano confocal ecuatorial de una célula HeLa marcada con Mitotracker green, dividida en las 4 regiones radiales: Nuclear, Perinuclear (Peri), Medial y Radial. (B) Distribución mitocondrial en células HeLa control (Con) o tratadas con forskolina (Forsk) determinada por microscopía confocal, expresada como el porcentaje de fluorescencia de Mitotracker green en las distintas regiones ejemplificadas en A. (C) Distribución mitocondrial, medida como en B, de células HeLa control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun) en presencia o ausencia de H89. N = 3. Por cada muestra independiente se analizaron entre 5 y 15 células. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0,05$  respecto al control, ns = no significativo. Barra = 10  $\mu$ m.

### 5.3. Caveolina-1 inhibe la comunicación RE-mitocondria

Dado que las células HeLa silvestres expresan bajos niveles de Cav1, se decidió analizar el efecto de incrementar en la expresión de esta proteína sobre la dinámica organelar. Para ello, se recurrió a células HeLa establemente transfectadas con un vector vacío (Mock) o uno que permite la expresión de Caveolina-1 (Cav1), para establecer el papel de esta proteína en la respuesta a estrés de RE. Nuevamente, la proximidad entre organelos se midió por colocalización RE-mitocondria en microscopía confocal. La expresión de Cav1 impidió el incremento en la colocalización RE-mitocondria inducida por estrés de RE (Figura 12A-B), sugiriendo un papel negativo de Cav1 en la comunicación RE-mitocondria.

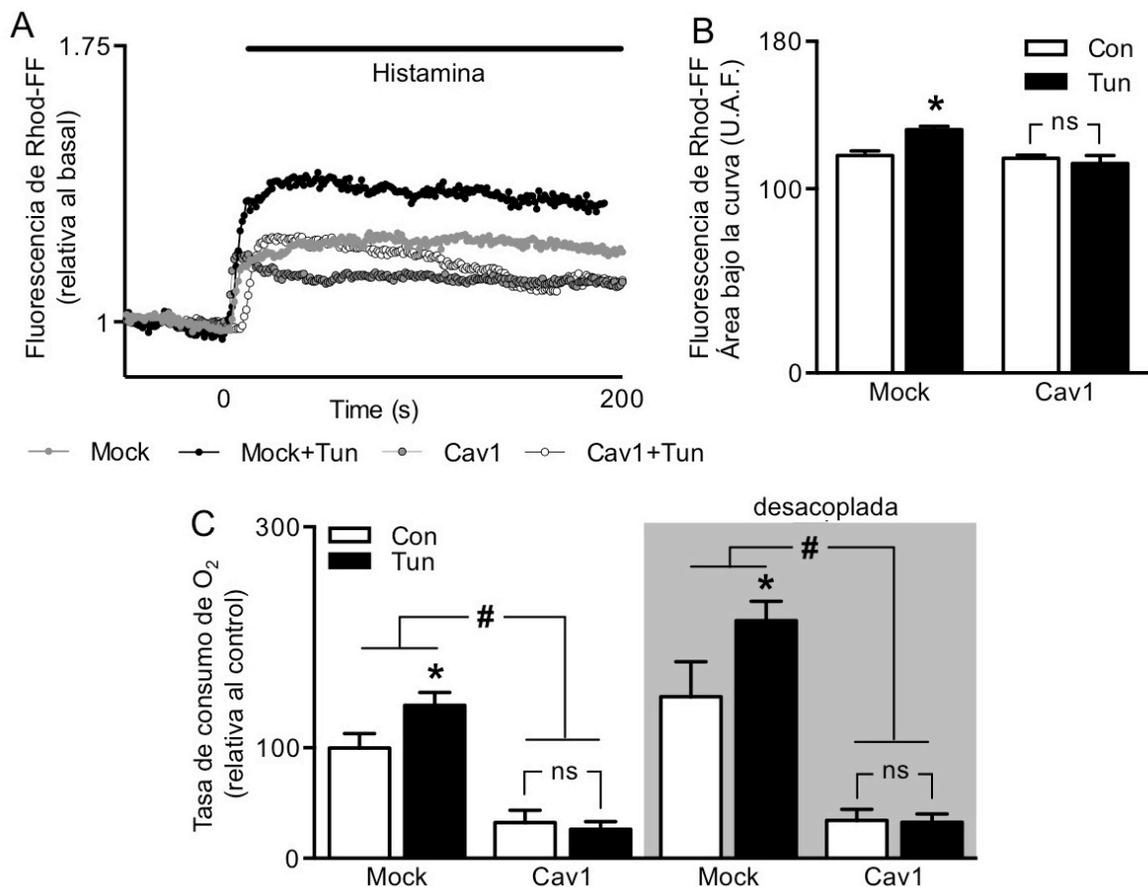


**Figura 12. Caveolina-1 inhibe la formación de contactos RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) Imágenes representativas del RE y mitocondria de células HeLa (Mock o Cav1) control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun). Los organelos se marcaron con Mitotracker green (verde) y RFP recombinante destinada al RE (rojo), para ser capturados mediante microscopía confocal. (B) Cuantificación

del coeficiente de Manders de las imágenes obtenidas como en A. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. Por cada muestra independiente se analizaron entre 5 y 15 células. \*  $P \leq 0,05$  respecto al control, ns: no significativo. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

Como ya se describió anteriormente, el sólo parámetro de colocación RE-mitocondria requiere de otras mediciones para establecer el estado funcional de esta proximidad. En concordancia con la medición de colocación, la expresión de Cav1 abolió también el incremento en la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 13A-B), así como la estimulación de la respiración mitocondrial (Figura 13C). Es más, la expresión de Cav1 redujo la tasa basal de respiración mitocondrial, indicando que Cav1 es un potente regulador negativo de la función mitocondrial, lo cual concuerda con los antecedentes en la literatura [Bosch *et al.*, 2011; Sotgia *et al.*, 2011]. El mecanismo por el cual esto ocurre sería por una disminución de la comunicación RE-mitocondria.



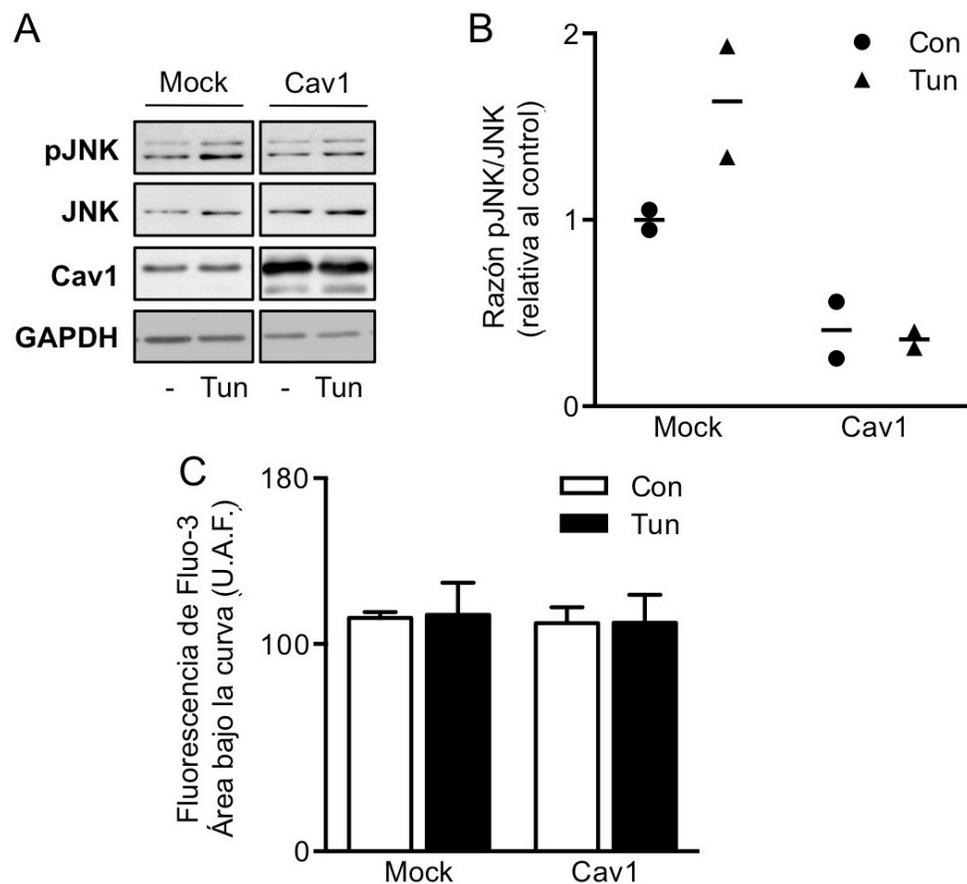
**Figura 13. Caveolina-1 inhibe la comunicación RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) Señal representativa de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial producida por estimulación con histamina en células HeLa (Mock o Cav1) control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun), medido por microscopía de fluorescencia. (B) Área bajo la curva de gráficos obtenidos como en A. U.A.F: unidades arbitrarias de fluorescencia. (C) Tasa de consumo de oxígeno basal y desacoplada medido en células HeLa (Mock o Cav1) control o tratadas con tunicamicina mediante electrodo de Clark. N = 3. Datos expresados como media ± SEM. \* P ≤ 0,05 respecto al control, #P ≤ 0,05 de las células Cav1 respecto a las mock. NS: no significativo.

A modo de control de que las células Cav1 no estén sometidas a niveles basales de estrés de RE, se midió a través de *western blot* la fosforilación de JNK. Ésta es una quinasa de respuesta a estrés, ubicada directamente río

abajo de los sensores de estrés de RE [Xu *et al.*, 2005]. Las células Mock, ante el tratamiento con tunicamicina, exhibieron un incremento en la fosforilación de JNK (pJNK), mientras que las células Cav1 mostraron bajos niveles de fosforilación, incluso ante estrés de RE (Fig.14A-B). Esto resulta indicativo de que las células Cav1 presentan bajos niveles de activación de la UPR, y por tanto, las observaciones de esta tesis no se deben a una aumentada señalización de estrés. Sin embargo, la ausencia de esta señalización sugiere alteraciones transduccionales a nivel del RE.

Para comprobar que estas observaciones se deban a cambios en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y no a alteraciones globales de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , se midió el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico usando la sonda Fluo-3-AM. Ni la sobreexpresión de Cav1 ni el estrés de RE provocaron alteraciones en la liberación total de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE (Figura 14C).

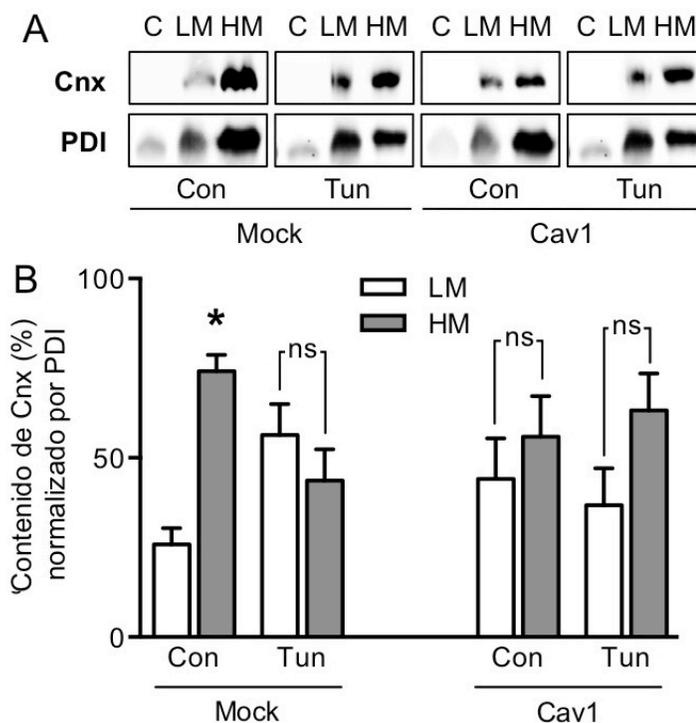


**Figura 14. Expresión de Cav1 no aumenta el estrés de RE.**

(A) *Western blot* representativo de JNK total, JNK fosforilado (pJNK), Cav1 y GAPDH como control de carga en células HeLa (Mock o Cav1) control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun). (B) Cuantificación de la razón pJNK/JNK las muestras obtenidas en A. (C) Área bajo la curva de gráficos de señales de  $Ca^{2+}$  citosólico producidas por estimulación con histamina en células HeLa (Mock o Cav1) control o tratadas con tunicamicina, marcadas con Fluo-3-AM y medido por microscopía de fluorescencia. U.A.F: unidades arbitrarias de fluorescencia. Paneles A y B: N = 2, cada punto corresponde a una muestra independiente, línea = media. Panel C: N = 3, datos expresados como media  $\pm$  SEM.

Para ensayar el efecto de Cav1 sobre los contactos RE-mitocondria, se realizó un fraccionamiento simple a través de sedimentación diferencial. Los homogenizados celulares se dividieron en: microsomas o membranas livianas (*light membranes*, LM), correspondientes a las endomembranas celulares;

membranas pesadas (*heavy membranes*, HM), correspondientes a las mitocondrias junto con las membranas que co-sedimentan con ellas, llamadas MAM; y el citosol (C), correspondiente a los elementos solubles. En estas fracciones se determinó el contenido de Calnexina, chaperona del RE que se redistribuye desde las MAM hacia las LM producto del estrés de RE [Lynes *et al.*, 2013]. Asimismo, las células Mock mostraron una redistribución de Calnexina desde HM a LM en respuesta a estrés de RE. Esta plasticidad, sin embargo, no se observó en células Cav1, en las cuales Calnexina está homogéneamente distribuida entre LM y HM (Figura 15A-B). A modo de control de carga de las distintas fracciones, se recurrió a la Protein Disulfuro Isomerasa (PDI), una oxidoreductasa luminal del RE, que se encuentra tanto en LM, HM y MAM, y su distribución permanece inalterada en condición de estrés de RE respecto a condición control [Bui *et al.*, 2010].



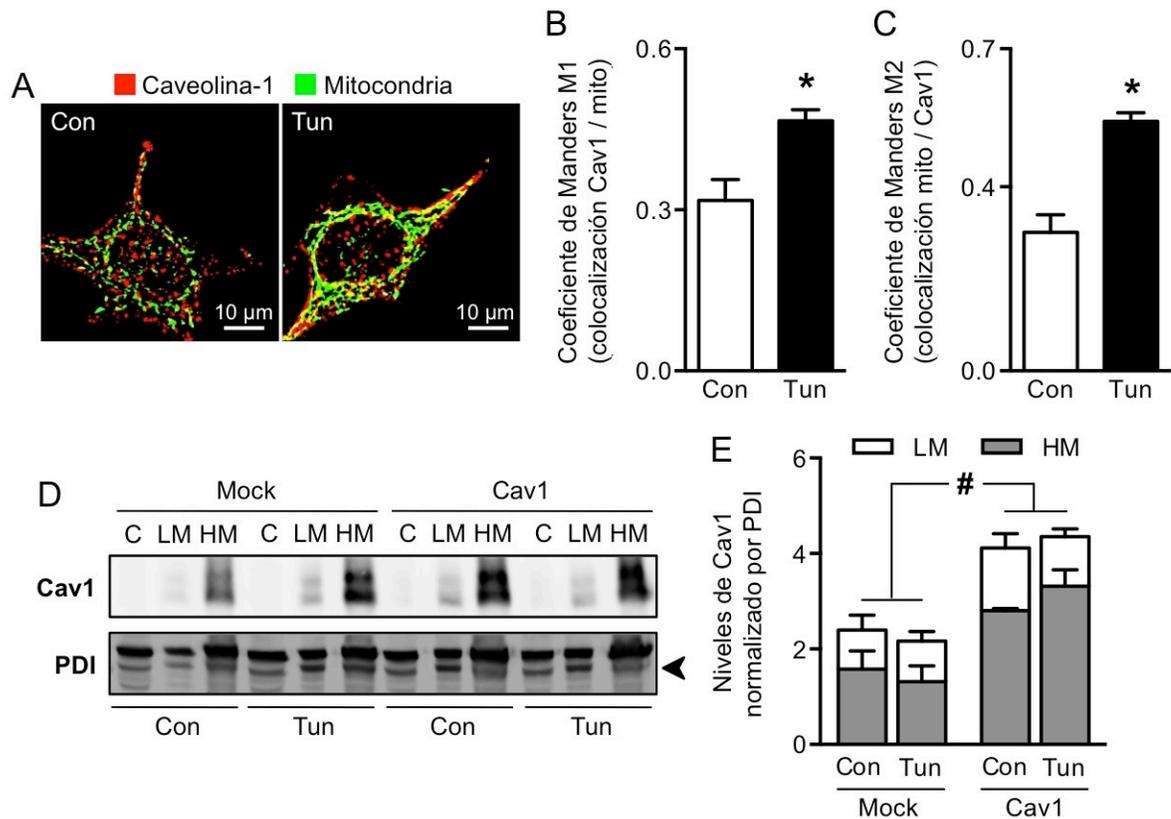
**Figura 15. Cav1 altera el remodelado de MAM en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) *Western blot* representativo de Calnexina (Cnx) y PDI en distintas fracciones de células HeLa (Mock o Cav1) control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun). C: citosol, LM: membranas livianas, HM: membranas pesadas. (B) Cuantificación del porcentaje de Calnexina en fracciones LM y HM de las muestras obtenidas en A, normalizado por PDI. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0,05$  respecto a LM de la misma condición, ns = no significativo.

Ya establecido que Cav1 altera la composición de los contactos RE-mitocondria, se determinó la presencia de la misma Cav1 en estos contactos. Mediante inmunofluorescencia en células HeLa silvestres se midió la colocalización entre Cav1 y mitocondria (Figura 16A), la cual se incrementó producto del estrés de RE (Figura 16B-C). Al analizar mediante fraccionamiento simple, se observó la ausencia de Cav1 del citosol, estando presente en LM y

especialmente en HM de células HeLa (Mock y Cav1), indicando un enriquecimiento en las MAM (Figura 16D). Producto de la sobreexpresión de Cav1, sus niveles totales aumentan, sin apreciarse un cambio significativo en su distribución (Figura 16E). El estrés de RE tampoco alteró la distribución de Cav1 en ninguno de los casos, sugiriendo que los cambios observados en la colocalización se deben a una mayor cercanía entre RE y mitocondria, en vez que a cambios en la composición de las MAM.

Para analizar las MAM en específico, se expandió el fraccionamiento simple, separando las HM en mitocondrias puras (Mito) y MAM, mediante un gradiente de densidad de Percoll (Figura 17A). Como marcadores de las fracciones se usaron: FACL4 (isoforma liviana) para MAM, citocromo c oxidasa subunidad IV (COX IV) para Mito y SERCA2b para RE. Se confirmó que Calnexina presente en las HM sólo se encuentra en MAM, no en Mito; y PDI se encuentra tanto en las LM, HM y MAM, con niveles traza en el citosol (Figura 17B).

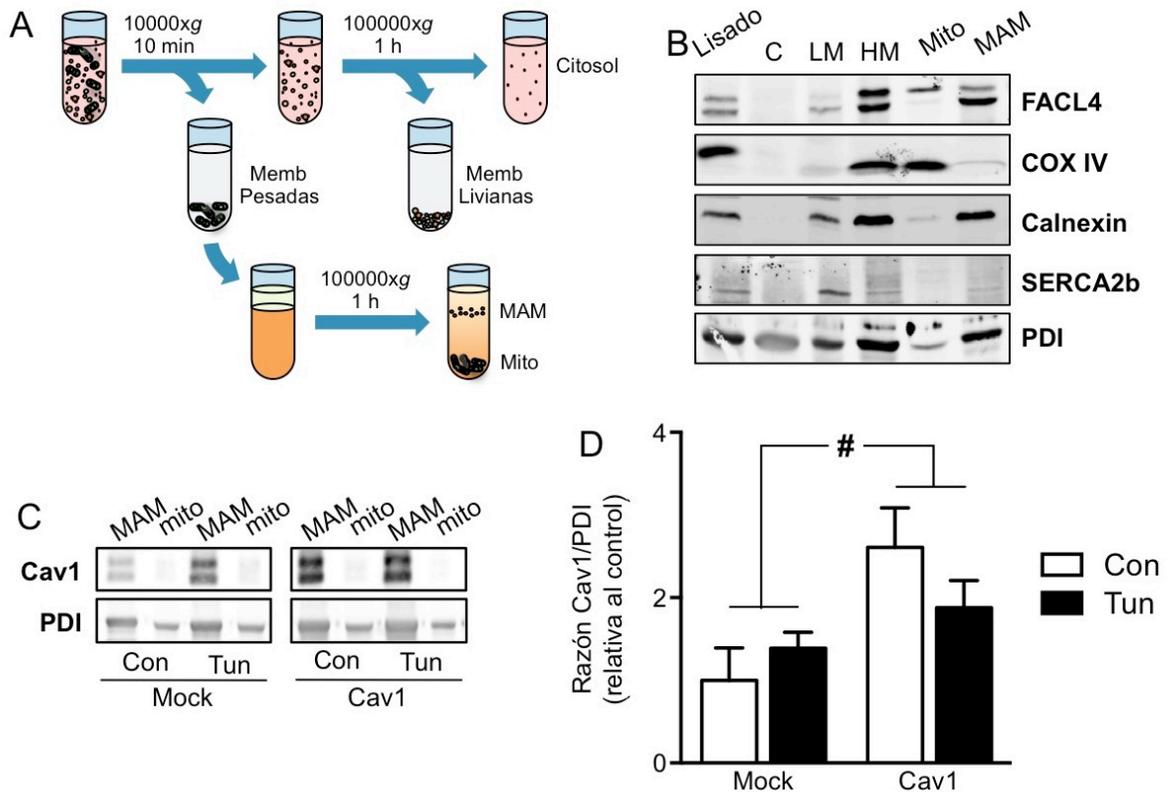


**Figura 16. Caveolina-1 está presente en los contactos RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) Imágenes representativas del Cav1 y mitocondria de células HeLa fenotipo silvestre control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun). Las células fueron marcadas con anticuerpos contra Cav1 y mtHSP70, para ser capturados mediante microscopía confocal. (B), (C) Cuantificación del coeficiente de Manders M1 y M2, respectivamente, de las imágenes obtenidas como en A. N: 3. Por cada muestra independiente se analizaron entre 5 y 15 células. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0,05$  respecto a control. (D) *Western blot* representativo de Cav1 en distintas fracciones de células HeLa (Mock o Cav1) control o tratadas con tunicamicina. Flecha negra: banda correspondiente a PDI. C = citosol, LM = membranas livianas, HM = membranas pesadas. (E) Cuantificación de los niveles de Cav1 en las fracciones celulares obtenidas como en D. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. # $P \leq 0,05$  de la condición Cav1 respecto a la condición Mock. Barra = 10  $\mu$ m.

Al analizar los niveles de Cav1 en Mito y MAM en las distintas condiciones, se observó que Cav1 presente en HM se encuentra en la fracción MAM, y no en

la mitocondria propiamente tal (Figura 17C). Además, al aumentar exógenamente la expresión de Cav1, los niveles de ésta aumentaron en las MAM, aunque no se observaron cambios frente a estrés de RE (Figura 17D).



**Figura 17. Caveolina-1 está presente en las MAM en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) Representación esquemática del protocolo de purificación de MAM. (B) *Western blot* representativo de marcadores de MAM (FACL4), mitocondria (COX IV) y RE (Calnexin, SERCA2b y PDI) obtenidos por el fraccionamiento indicado en A. (C) *Western blot* representativo de Cav1 y PDI en fracciones de células HeLa (Mock o Cav1) control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun). (D) Cuantificación de los niveles de Cav1 en MAM de las muestras obtenidas en C, normalizado por PDI. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. #P  $\leq$  0,05 de la condición Cav1 respecto a la condición Mock.

De los resultados aquí expuestos se puede concluir que Cav1 se encuentra presente en las MAM, actuando como un regulador negativo de la

comunicación RE-mitocondria en respuesta a estrés de RE. Es a la vez un potente supresor de la respiración mitocondrial en general. Las células que sobreexpresan Cav1 muestran a Calnexina homogéneamente distribuida entre las LM y HM, similar a las células Mock sometidas a estrés, basado en PDI como normalizador. Esta pérdida de plasticidad en la composición de las MAM coincide con la incapacidad de incrementar la comunicación RE-mitocondria en respuesta a estrés de RE. Por otro lado, este remodelado basal de las MAM exhibido por las células que sobreexpresan Cav1 podría deberse a un mecanismo compensatorio, producto de una menor actividad mitocondrial basal.

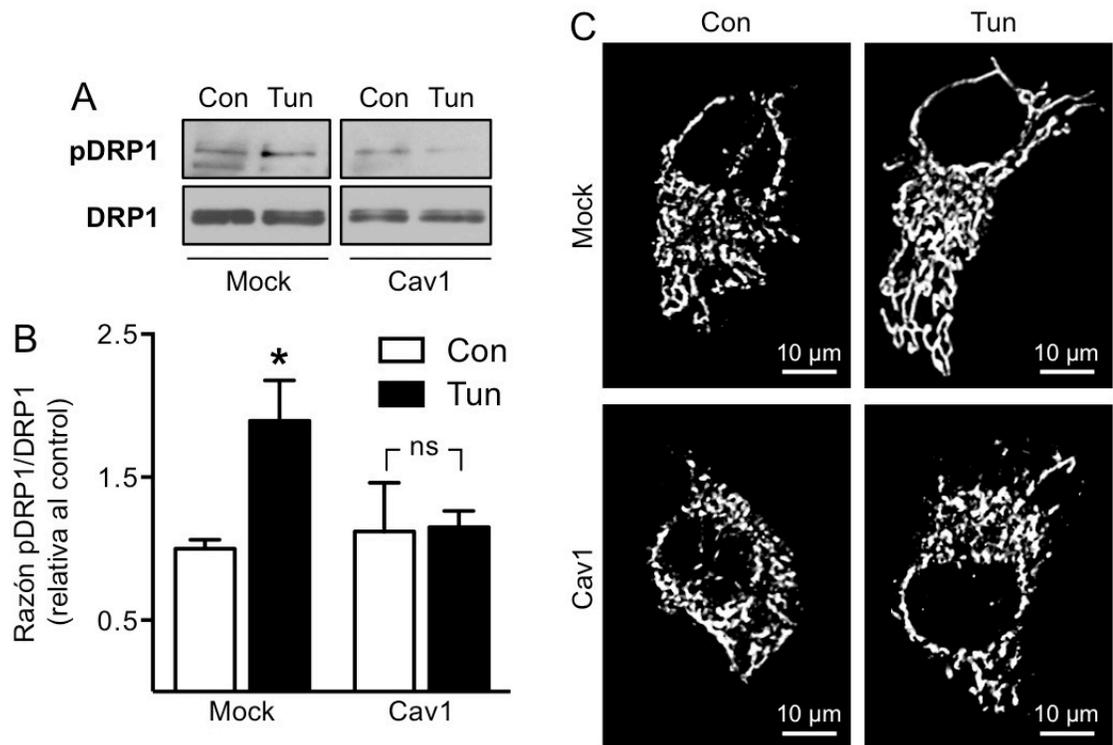
#### **5.4. Caveolina-1 antagoniza la señalización de PKA en la fase temprana del estrés de RE**

---

Para determinar si el efecto negativo de Cav1 se debe a un antagonismo con PKA, se comparó la activación de PKA en células HeLa (Mock y Cav1). Igual que las silvestres, las HeLa (Mock) mostraron un aumento en la fosforilación de DRP1 frente a estrés de RE temprano (Figura 18A), concomitante con elongación mitocondrial (Figura 18B). La expresión de Cav1 abolió ambos efectos, evidenciando un efecto negativo sobre la activación de PKA.

Para analizar la distribución de PKA durante el estrés de RE temprano, se midió la subunidad regulatoria PKA RIIa en las distintas fracciones mediante

fraccionamiento simple. Se eligió esta subunidad de PKA dado que ésta es la que determina la localización de la holoenzima, mediante su unión a AKAPs. La subunidad catalítica en cambio, al carecer de anclaje, se presenta siempre homogénea en todas las fracciones (datos no mostrados).

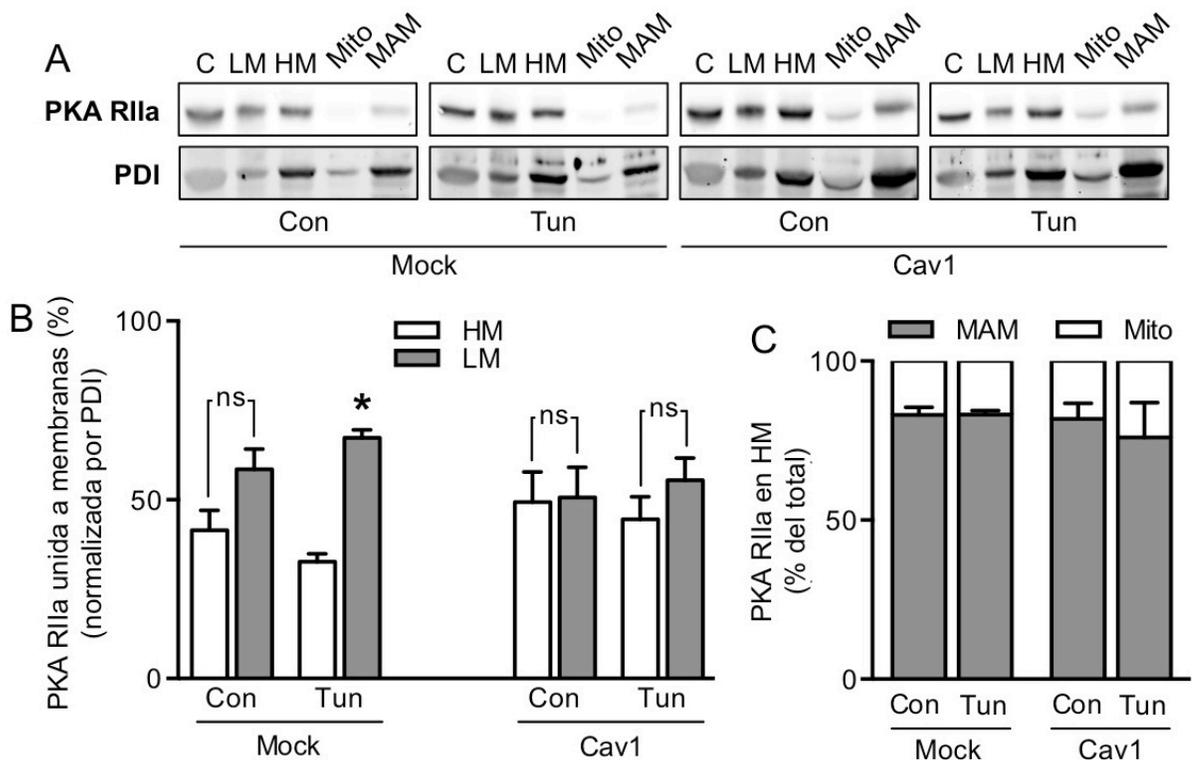


**Figura 18. Cav1 inhibe la fusión mitocondrial mediada por PKA en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) *Western blot* representativo de DRP1 total y DRP1 fosforilado en Ser637 en células HeLa (Mock o Cav1) control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun). (B) Cuantificación de las muestras obtenidas en A. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0,05$  respecto al control, ns = no significativo. (C) Imágenes representativas de la red mitocondrial de células HeLa (Mock o Cav1) control o tratadas con tunicamicina. Barra = 10  $\mu$ m.

En células Mock, PKA RIIa se redistribuyó hacia la fracción microsomal durante estrés de RE, lo que fue totalmente abolido por la expresión de Cav1 (Figura 19A-B). Esta translocación de PKA hacia LM podría relacionarse con

fosforilación de sustratos en la superficie del RE. El mismo DRP1, por ejemplo, regula la morfología del RE en respuesta a estrés de RE [Wikstrom *et al.*, 2013]. De la PKA RIIa presente en las HM, ésta se encontró principalmente en las MAM; sin embargo, la proporción entre Mito y MAM no se alteró por estrés de RE ni por Cav1. En síntesis, la sobreexpresión de Cav1 impidió la redistribución de PKA hacia LM en respuesta a estrés de RE, provocando su retención en HM.



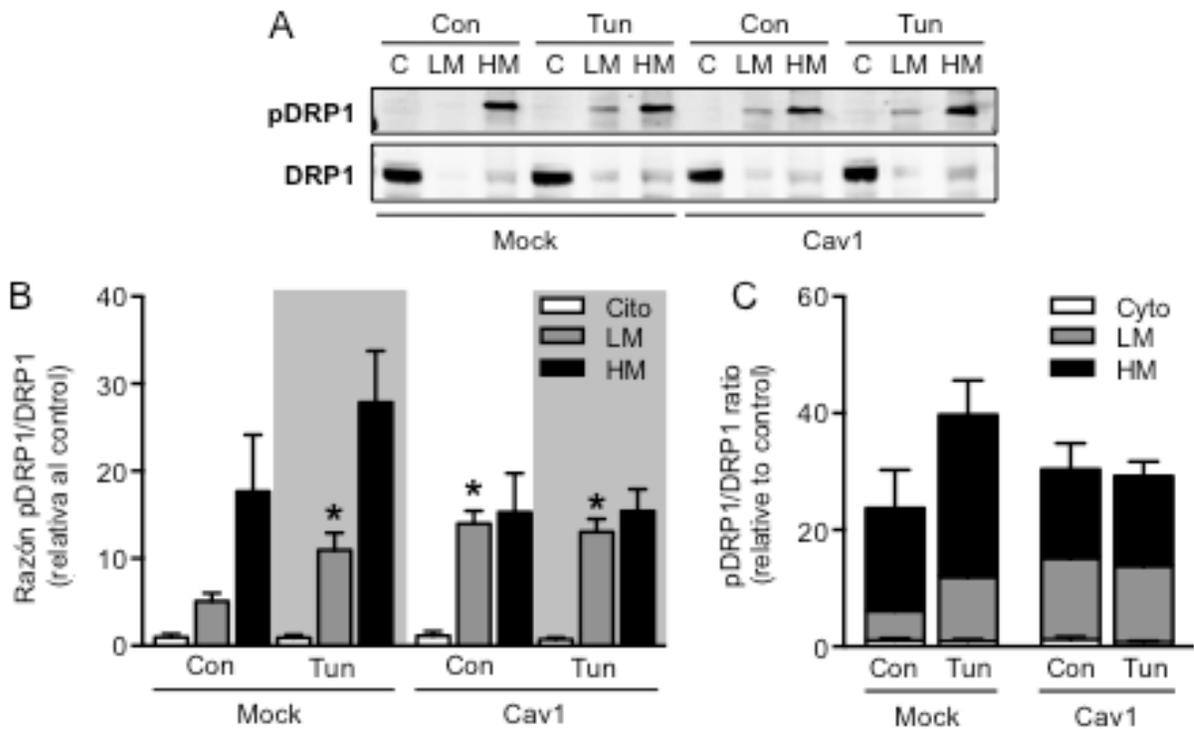
**Figura 19. Cav1 altera la relocalización de PKA en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) *Western blot* representativo de PKA RIIa y PDI en distintas fracciones de células HeLa (Mock o Cav1) control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun). C: citosol, LM: membranas livianas, HM: membranas pesadas. (B) Cuantificación del porcentaje de PKA RIIa en fracciones LM y HM de las muestras obtenidas en A, normalizado por PDI. (C) Cuantificación del porcentaje de PKA RIIa en fracciones Mito y MAM de las muestras obtenidas en A. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \*P  $\leq$  0,05 respecto a LM de la misma

condición, ns = no significativo.

Para analizar no sólo la distribución de PKA, sino también su señalización, se midió la fosforilación de DRP1 en las distintas fracciones celulares. En todas las células en estudio, DRP1 se encontró mayoritariamente en el citosol, con bajos niveles en LM y HM (Figura 20A). En células HeLa (Mock), en condiciones basales se encontró cierto grado de fosforilación de DRP1, principalmente en la fracción HM, baja fosforilación en LM y prácticamente nula en el citosol. Luego de 4 h de estrés de RE, se observó un incremento en la fosforilación de DRP1, el cual se observa como una tendencia en HM y resultó significativo en LM (Figura 20B). Esta fosforilación aumentada en LM coincide con el incremento de PKA RIIa en esa fracción, así como con un potencial rol de DRP1 en el remodelado del RE en respuesta a estrés. Al visualizar los datos de todas las fracciones agrupados, para cada condición (Figura 20C), se aprecia que la sumatoria de las señales se asemeja a los niveles totales de DRP1 fosforilado (Figura 18B). En células HeLa (Cav1), en cambio, se observó un incremento en la fosforilación de DRP1 únicamente en la fracción LM ya en la condición basal, la cual se mantuvo invariable frente a etapas tempranas del estrés de RE. A pesar de este aumento, si se analiza la sumatoria de DRP1 fosforilado en las distintas fracciones (Figura 20C), no se observa un incremento aparente en los niveles globales de fosforilación de DRP1. Este resultado sugiere que tanto HM como en LM contribuyen a dar forma a los cambios globales observados en la

fosforilación de DRP1. Este resultado sugiere que en las células que expresan Cav1, la fosforilación de DRP1 en la fracción HM es deficiente, lo cual coincide con la retención de PKA en esa fracción. Por su parte, en la fracción LM hay un incremento basal en la fosforilación de DRP1, probablemente compensatorio a la menor fosforilación en HM. De este modo, existe una desregulación de la señalización de PKA, la cual no puede incrementar la fosforilación de DRP1 en HM, posiblemente por la presencia de Cav1, ni tampoco en LM, debido a que basalmente DRP1 se encuentra fosforilado. Tal como se observó para la distribución de Calnexina (Figura 15), se confirma que estas células presentan alteraciones basales en el RE, lo que impide la plasticidad organelar en respuesta a estrés.

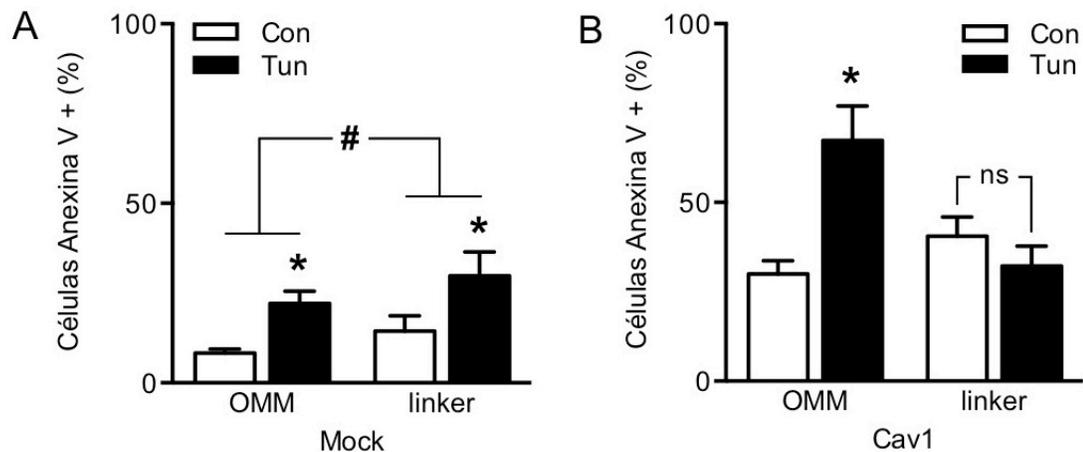


**Figura 20. Cav1 altera la localización de la fosforilación de DRP1 en la fase temprana del estrés de RE.**

(A) *Western blot* representativo de DRP1 total y DRP1 fosforilado en distintas fracciones de células HeLa (Mock o Cav1) control (Con) o tratadas con tunicamicina (Tun). C = citosol, LM = membranas livianas, HM = membranas pesadas. (B) cuantificación de las muestras obtenidas en A. (C) Mismos datos que en B, representados en barras apiladas. N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0,05$  respecto al LM de condición control (Mock).

Finalmente, se evaluó el efecto de Cav1 y la comunicación RE-mitocondria sobre la sobrevivencia celular ante un estímulo de muerte. Para ello, tanto células Mock como Cav1 se transfectaron con una proteína RFP dirigida a la mitocondria (OMM), o bien, destinada tanto a la OMM como al RE (linker), este último actuando como un inductor artificial de contactos RE-mitocondria [Csordás *et al.*, 2006]. Las células así tratadas se expusieron a condición control o a tunicamicina 10  $\mu\text{g/ml}$  por 24 h. Mediante citometría de flujo se

determinó, en las células marcadas con RFP, indicios de apoptosis por exposición de fosfatidilserina en la superficie celular. En las células Mock, el tratamiento indujo apoptosis tanto en las células transfectadas con RFP-OMM como con RFP-linker (Figura 21A). La construcción linker, en general, tuvo un ligero pero significativo efecto incrementando la muerte celular en las células Mock. Esto se debe, posiblemente, a que favorece en exceso la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre RE y mitocondria, contribuyendo a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial, y así a la muerte celular. Por su parte, las células Cav1 presentaron niveles basales de muerte más elevados que las células Mock, en concordancia con el papel supresor de tumores de Cav1 (Figura 21B). En las células transfectadas con RFP-OMM, el tratamiento con tunicamicina incrementó la muerte celular, tal como ocurre con las células Mock. En las células Cav1 transfectadas con RFP-linker, en cambio, el tratamiento no incrementó la muerte celular, sino que ésta se mantuvo en niveles basales. Este efecto se debería a que el linker restaura los contactos RE-mitocondria en estas células a niveles que permiten la adaptación al estrés de RE.



**Figura 21. Los contactos RE-mitocondria regulan la viabilidad celular en la fase temprana del estrés de RE.**

(A y B) Porcentaje de células HeLa (Mock o Cav1, respectivamente) control o tratadas con tunicamicina que presentan indicio de apoptosis. Las células fueron transfectadas con plasmidios de expresión control (OMM) o que inducen artificialmente la unión RE-mitocondria (linker), en ambos casos, acoplado a proteína RFP. Se cuantifica el porcentaje de células positivas para la marca roja que dan positivo para la marca de Anexina V (verde). N = 3. Datos expresados como media  $\pm$  SEM. \*P  $\leq$  0,05 respecto al control de la misma condición, ns = no significativo, #P  $\leq$  0,05 de la transfección con OMM respecto a la transfección con linker.

En conclusión, la sobreexpresión de Cav1 altera la señalización de PKA. Esto resulta en que la célula pierde su capacidad de responder frente a estrés de RE, impidiendo el incremento de los contactos RE-mitocondria, la transferencia de  $Ca^{2+}$  entre ambos organelos y el metabolismo mitocondrial. Producto de lo anterior, la expresión de Cav1 vuelve a las células más sensibles al estrés de RE. La restauración artificial de los contactos RE-mitocondria permite a la célula una mejor adaptación ante el estrés de RE.

## 6. DISCUSIÓN

La presente tesis explora las rutas de señalización que regulan el aumento en los contactos RE-mitocondria en la fase temprana del estrés de RE descrito en un trabajo anterior [Bravo *et al.*, 2011].

### 6.1. Proteína quinasa A y dinámica organelar

---

Por un lado, este trabajo mostró que PKA es un regulador positivo del aumento de los contactos RE-mitocondria; sin embargo, el mecanismo por el cual realiza esta acción aún se desconoce. Aquí se analizó uno de los blancos de PKA, Ser637 de DRP1, cuya fosforilación resulta inhibitoria para su actividad constrictora, favoreciendo así la elongación mitocondrial. No obstante, a la fecha no existen antecedentes de un posible mecanismo que vincule a DRP1 con el incremento en los contactos RE-mitocondria. Un potencial mecanismo podría ser a través de Mfn2, GTPasa participante en la interacción física RE-mitocondria. Al respecto, un par de trabajos sugieren que puede ser regulada por PKA a nivel de fosforilación [Zhou *et al.*, 2010] o a nivel de masa de la proteína [Morales *et al.*, 2014]. Experimentos adicionales serán necesarios para diferenciar entre ambas alternativas.

La autofagia y el estrés de RE son procesos estrechamente relacionados entre sí: ambos se producen por condiciones de estrés comunes (hipoxia, privación de nutrientes, mal plegamiento proteico, etc.), y ambos evocan

respuestas que apuntan a la recuperación de la proteostasis [Appenzeller-Herzog *et al.*, 2012]. Más aún, la señalización inducida por estrés de RE induce autofagia, y a su vez, defectos en la autofagia conducen a estrés de RE. Esta tesis, por su parte, presentó a PKA como una nueva arista de convergencia entre ambas condiciones, ya que previamente se había descrito que durante la autofagia también se activa PKA en forma temprana, la cual evita la degradación de las mitocondrias mediante la inducción de la fusión mitocondrial [Gomes *et al.*, 2011]. Algunos reportes, tanto en levaduras [Budovskaya *et al.*, 2004] como células humanas [Mavrakis *et al.*, 2006], han mostrado que PKA actúa como inhibidor de la iniciación de la autofagia, mediante la regulación directa de mTOR en los sitios de formación de vesículas autofágicas, denominadas autofagosomas [Mavrakis *et al.*, 2007]. En el presente trabajo, se mostró que PKA no sólo regula la morfología mitocondrial, sino también los contactos entre organelos. De esta forma, PKA se convierte en una ruta de señalización que coordina en forma localizada la dinámica organelar de acuerdo a condiciones de estrés: por un lado, estimula la formación de contactos RE-mitocondria a la vez que previene la formación de autofagosomas. Precisamente, los puntos de contacto RE-mitocondria han sido señalados como sitios potenciales de formación de autofagosomas [Hamasaki *et al.* 2013]. En conjunto, estas evidencias sugieren que la activación de PKA conduce a una respuesta temprana que estimula la formación de contactos RE-mitocondria

como un eje de señalización metabólico, previniendo que estos puntos sean utilizados como sitios de formación de autofagosomas. Potencialmente, una inactivación posterior de PKA podría permitir la iniciación de la autofagia; sin embargo, para evaluar esta posibilidad se requiere de mayor experimentación.

Destacablemente, se observó que tanto la morfología mitocondrial como los contactos RE-mitocondria son regulados en forma conjunta. Esta sincronización resulta esperable, ya que ambos son factores que determinan la capacidad mitocondrial para captar  $\text{Ca}^{2+}$  [Bravo *et al.*, 2011; Szabadkai *et al.*, 2004], y así, impactan múltiples procesos fisiológicos. Además, ya se ha mostrado que otras proteínas participan en la morfología y contactos organelares, como por ejemplo Mfn2 [de Brito y Scorrano, 2008] y DRP1 [Friedman *et al.*, 2011].

Una tercera arista de la dinámica organelar es la distribución de los organelos dentro del espacio celular. Aquí se mostró que PKA regula la distribución mitocondrial en respuesta a estrés de RE, la cual es un factor que da forma a la función mitocondrial, como la generación localizada de ATP o la amortiguación de  $\text{Ca}^{2+}$  en microdominios de alta concentración [Kuznetsov *et al.*, 2009]. Ya se había descrito que en respuesta a estrés de RE ocurre una agrupación perinuclear de mitocondrias, la cual depende de microtúbulos [Bravo *et al.*, 2011], y en el presente trabajo se mostró que además depende de PKA. La finalidad de esta redistribución aún es desconocida; sin embargo, parece

estar relacionada especialmente con el estrés de RE, ya que no ocurre durante la autofagia generada por inhibición de mTOR (datos no mostrados). Por lo tanto, se especula que podría estar asociada a la restitución de la proteostasis, mediante la entrega de ATP a regiones perinucleares del RE, que es donde ocurre el plegamiento, control de calidad y degradación de proteínas [Leitman *et al.*, 2013]. Aparentemente, este rol metabólico de la unión RE-mitocondria es fundamental para la supervivencia celular, siendo más relevante que la capacidad de amortiguación local de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto se evidencia en que si se inhibe la producción mitocondrial de ATP con oligomicina, la viabilidad celular frente a tratamiento con tunicamicina se ve comprometida, aún cuando la captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  debiese mantenerse completamente funcional [Bravo *et al.*, 2011]. El mecanismo que lleva a la agrupación perinuclear de las mitocondrias sería mediante el complejo Dineína-Dinactina, el cual se ha descrito que lleva a cabo en respuesta a infección viral en líneas celulares hepáticas [Kim *et al.*, 2007]. Más aún, PKA regula este complejo, favoreciendo la agrupación perinuclear de otros organelos, conocidos como cuerpos de Weibel-Palade, propios de células endoteliales [Rondaj *et al.*, 2006].

Como determinantes del metabolismo celular, AMPK y PKA tienen en común que ambas estimulan la respiración mitocondrial. Una investigación reciente muestra que en células  $\beta$ -pancreáticas sometidas a estrés de RE, AMPK fosforila a DRP1 en la serina 637 [Wikstrom *et al.*, 2013]. Sin embargo,

en el presente trabajo, la fosforilación de ese sitio y el consecuente efecto metabólico requieren de la actividad de PKA solamente, y no la de AMPK. Esta diferencia en la señalización es atribuible al tipo celular, ya que en las células  $\beta$ -pancreáticas secretan insulina en respuesta a variaciones en los niveles de ATP celular. Por lo tanto, el monitoreo del estado metabólico se vuelve especialmente importante, sobre todo por AMPK, que se activa de acuerdo a variaciones en el ATP y AMP [Fu *et al.*, 2013].

En cuanto a la vía transduccional que conduce a la activación de PKA, ésta es aún desconocida. Para el caso de la activación de PKA durante autofagia, se mostró que ocurre una generación de cAMP rápida en respuesta a la privación de nutrientes [Gomes *et al.*, 2011]; sin embargo, la fuente de ese cAMP aún es desconocida. Existen varias adenilato ciclasas (AC) en la célula que producen cAMP a partir de ATP. Éstas se clasifican en: AC solubles (sAC) activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  o bicarbonato/ $\text{CO}_2$ /pH, o AC transmembrana (tmAC) activadas por proteínas G heterotriméricas. En el caso de AC solubles, éstas se encuentran en compartimentos como el núcleo, citoplasma o matriz mitocondrial, y actúan principalmente como sensores locales de ATP [Steegborn *et al.*, 2014]. Debido a esto último, y considerando que también ocurre producción de cAMP durante la privación de nutrientes, las sAC son un buen candidato para el escenario del estrés. Dado que la mitocondria es impermeable al cAMP [Di Benedetto *et al.*, 2013] y la fosforilación de DRP1

observada en esta tesis es extramitocondrial, se plantea que es una sAC soluble citoplasmática la responsable de estos cambios. Sin embargo, esto no descarta una posible activación de sAC mitocondrial. Por otro lado, las tmAC se encuentran presentes en las membranas internas de la célula, así como sistemas de proteínas G heterotriméricas que podrían activarlas. A modo de ejemplo, la secuencia KDEL retiene a las proteínas en el RE, evitando su tráfico por el resto de la ruta de secreción. Cuando las proteínas con secuencia KDEL se escapan de este control, transitan hacia el aparato de Golgi donde son reconocidas por el receptor de KDEL, el cual está acoplado a proteína G. Ésta última estimula directamente a una tmAC, iniciando así la producción de cAMP en la superficie del aparato de Golgi. Esto conduce a la estimulación de PKA y mediante ésta, al transporte retrógrado que devuelve las proteínas al RE [Cancino *et al.*, 2014]. Del mismo modo, algún sensor no conocido en la superficie del RE acoplado a proteína G podría ser responsable de la estimulación de tmAC en su superficie, la activación de PKA y la fosforilación localizada de DRP1.

Respecto a la fosforilación de DRP1, ésta se encontró aumentada de manera significativa en la fracción LM frente a estrés de RE y producto de la sobreexpresión de Cav1. Como ya se ha observado en otro trabajo [Wikstrom *et al.*, 2013], esta fracción de DRP1 está asociada con un cambio adaptativo en la morfología del RE en respuesta a la condición de estrés. De esta forma, la

fosforilación de DRP1 permite una modulación dual: por un lado disminuye su actividad constrictora mitocondrial, a la vez que permite un incremento de tamaño en el RE. Una sincronía de ambos procesos favorecería la sobrevida a estrés de RE, lo cual se aprecia en la importancia de PKA para la sobrevida frente a dosis letales de tunicamicina [Takano *et al.*, 2007]. El mecanismo que permite a DRP1 regular la morfología del RE es un tema aún inexplorado. Ya que la fosforilación en Ser637 mediada por PKA tiene carácter inhibitorio, este mecanismo debe ser independiente de su actividad GTPasa, ocurriendo, posiblemente, a través de interacción con otros componentes celulares. Estudios imagenológicos han mostrado que DRP1 en la mitocondria interactúa con filamentos de actina que están anclados al RE, lo cual proporciona la fuerza para realizar la constricción mitocondrial [Korobova *et al.*, 2013]. Mediante este mecanismo, DRP1 podría no sólo participar en la fragmentación mitocondrial, sino además, regular la formación o estabilidad de estos filamentos de actina, actuando así como un puente proteico que permita tanto la formación de contactos RE-mitocondria como el remodelado de las cisternas del RE.

Mediante una estrategia de fraccionamiento subcelular, el presente trabajo mostró cambios en la distribución de DRP1 fosforilado, como indicador de los sitios donde PKA tendría mayor actividad. Sin embargo, esta estrategia tiene la limitación de no evaluar la importancia de la localización de PKA para la comunicación entre organelos. El incremento en la expresión de Cav1 alteró la

localización de PKA, previniendo el aumento en la fosforilación de DRP1. Sin embargo, es necesaria una estrategia de rescate de la localización de PKA para establecer que ése es el mecanismo por el cual Cav1 interfiere con la actividad de PKA. A nivel experimental, este rescate podría realizarse a través de la sobreexpresión de AKAPs que cuenten con señales de destinación a distintos compartimentos. D-AKAP1, por ejemplo, está codificada en un gen que produce 2 variantes: una destinada al RE y otra a la mitocondria [Huang *et al.*, 1999]. De este modo, la variante destinada al RE podría evitar la retención de PKA en la mitocondria que ocurre por la sobreexpresión de Cav1, y así prevenir, potencialmente, la pérdida de viabilidad observada en estas células. Otra limitación del presente trabajo es el uso de H89 para evaluar la activación de PKA. Este inhibidor puede inhibir a otras quinasas, además de tener otros efectos independientes de PKA [Lochner y Moolman, 2006]. Por lo tanto, su uso como indicador de la actividad de PKA debiese estar acompañada de otra estrategia, como el silenciamiento génico mediante un siRNA específico. Además, como ya se mencionó, el sitio de fosforilación de DRP1 (Ser637) que se utilizó como indicador de la activación de PKA, también es blanco de otras quinasas, como AMPK, lo que admite la participación de otras vías de señalización en el proceso. Para el caso particular de AMPK, su contribución a la respuesta adaptativa entre RE y mitocondria se descartó, gracias al uso del inhibidor Compuesto C. Sin embargo, más experimentación es necesaria para

establecer con mayor certeza que los eventos observados se deben únicamente a la acción de PKA.

## **6.2. Cav1 y metabolismo celular**

---

Para evaluar la participación de Cav1 en la comunicación RE-mitocondria, en este trabajo se recurrió a la sobreexpresión estable en células HeLa, las cuales expresan niveles relativamente bajos de Cav1. Se ha señalado que durante la tumorigénesis, la pérdida de expresión de Cav1 está asociada con la formación de tumores, y una posterior re-expresión se relaciona con un incremento en la capacidad metastásica [Quest *et al.*, 2008]. De este modo, la estrategia de sobreexpresión permite analizar el efecto de Cav1 en el contexto de una célula tumoral, y cómo altera su señalización y adaptación metabólica. Para complementar esta estrategia, se debe recurrir al silenciamiento de Cav1 en células que expresan niveles mayores de esta proteína. De esta forma, podrían corroborarse las observaciones aquí realizadas, a la vez de determinar describir los cambios en la comunicación de organelos en la tumorigénesis.

El incremento en la expresión de Cav1 se mostró como un regulador negativo de la comunicación RE-mitocondria. Esto concuerda con otros reportes que indican a Cav1 como un inhibidor de la actividad mitocondrial [Bosch *et al.*, 2011; Sotgja *et al.*, 2011]. En la presente tesis, ampliamos los mecanismos que dan cuenta de esta acción. Principalmente, la expresión de Cav1 previene la

fosforilación de DRP1 por PKA en respuesta a estrés de RE, evitando así el incremento de la fusión mitocondrial, y la estimulación de la comunicación RE-mitocondria. Este mecanismo logra explicar la pérdida de la respuesta adaptativa mitocondria frente al estrés; sin embargo, la actividad mitocondrial ya se encuentra disminuida en células HeLa (Cav1) en reposo, indicando que se trata no sólo de la respuesta adaptativa la que se encuentra afectada, sino además la maquinaria metabólica basal. Al respecto, se sabe que Cav1 regula el flujo de colesterol a lo largo de los sistemas de endomembranas celulares [Gu *et al.*, 2014], incluyendo la transferencia de colesterol entre RE-mitocondria. En el pasado, se ha reportado que una pérdida en la expresión de Cav1 provoca una sobrecarga de colesterol en la mitocondria, alterando el funcionamiento de la cadena respiratoria, generando altos niveles de ROS y provocando así disfunción mitocondrial [Bosch *et al.*, 2011]. Para el caso de la presente tesis, la expresión de Cav1 podría estar alterando la homeostasis del colesterol en sentido contrario, afectando tanto la composición lipídica de las mitocondrias como de las MAM. En el caso de las MAM, este mecanismo podría explicar la redistribución basal de Calnexina: la señal que retiene a Calnexina en la interface RE-mitocondria es de naturaleza lipídica (palmitoilación), por lo tanto, una disrupción de la composición lipídica de las MAM bien podría alterar la localización de Calnexina [Lynes *et al.*, 2013]. Para el caso del efecto directo de Cav1 sobre la mitocondria, el panorama es más

complejo. En general, varios reportes concuerdan con este trabajo en que mayores niveles de Cav1 conducen a una menor actividad mitocondrial en células tumorales [Bosch *et al.*, 2011; Sotgia *et al.*, 2011; tesis doctoral de Yenniffer Ávalos]; sin embargo, el mecanismo por el cual opera la expresión de Cav1 aún no está resuelto. Contrariamente a las evidencias anteriores, se ha descrito que Cav1 destinada a la mitocondria o la sobreexpresión de Cav3 tienen un efecto positivo sobre la bioenergética mitocondrial en cardiomiocitos [Fridolfsson *et al.*, 2012]. En ese caso, no sólo el modelo celular es distinto, sino que está asociado con un ingreso de caveolina al interior de la mitocondria, proveniente de caveolas en la membrana plasmática. En la presente tesis, en cambio, Cav1 es extramitocondrial, encontrándose en el RE en aposición a la mitocondria. En suma, estas evidencias sugieren que el efecto de Cav1 sobre la función mitocondrial es dependiente de su localización subcelular, la cual a su vez puede estar determinada por el tipo celular.

Desde un punto de vista metabólico, los resultados de esta tesis concuerdan con el papel propuesto para Cav1 en la “sinergia metabólica” de los tumores sólidos [Martinez-Outschoorn *et al.*, 2014]: en condiciones normales, la presencia de Cav1 mantiene baja la actividad mitocondrial –entre otros efectos– evitando la generación de tumores. La pérdida de Cav1 exagera la actividad mitocondrial, incrementando la formación de ROS, llevando a inestabilidad genómica y tumorigénesis (efecto Warburg inverso), lo cual concuerda con

Cav1 actuando como un supresor de tumores. En contraste, la re-expresión de Cav1 en tumores avanzados promueve la metástasis [Quest *et al.*, 2008]. No obstante, esta capacidad metastásica se ha asociado igualmente con una producción exacerbada de ROS mitocondriales [Porporato *et al.*, 2014]. Por tanto, el papel de promover malignidad de Cav1 no parece estar relacionado con una regulación negativa del metabolismo mitocondrial, sino más bien con otros aspectos de la fisiología celular como la activación descrito recientemente de un nuevo eje de señalización río abajo de Cav1 fosforilada en tirosina-14 involucrando a Rab5, Tiam y Rac1 [Díaz *et al.*, 2014]. Considerando que la fase metastásica requiere de un extensivo remodelado en términos de señalización, metabolismo, expresión génica, etc., no es extraño que una re-expresión de Cav1 en esta etapa tuviera efectos distintos a lo que ocurre durante condiciones normales.

En células transformadas mediante sobreexpresión de H-Ras, se mostró que la disminución de Cav1 es responsable de alteraciones en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular [Rimessi *et al.*, 2014]. En aquel trabajo, Cav1 incrementa la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de la célula, favoreciendo así su susceptibilidad a muerte celular, actuando como un supresor de tumores. Este proceso se debería a un incremento en el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular, realizado por la comunicación entre RE y membrana plasmática. En el caso del presente trabajo, se expande el papel de los contactos entre organelos en la

regulación de la muerte celular. Por un lado, la expresión de Cav1 tiene un efecto deletéreo (Figura 21) ya que la escasez de contactos RE-mitocondria impide una adaptación metabólica, así como puede afectar la capacidad amortiguadora de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Debido a ello, la restitución de los contactos RE-mitocondria restaura la viabilidad celular en respuesta a estrés (Figura 21B). Por el contrario, las células con bajos niveles de Cav1 presentan cierto grado de protección contra la muerte celular (Figura 21A); no obstante, éste se pierde al incrementar artificialmente los contactos RE-mitocondria, ya que conduciría a una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria, favoreciendo así la muerte celular [Csordás *et al.*, 2006]. Esto convierte a la interface RE-mitocondria en una verdadera espada de doble filo, donde una desregulación positiva o negativa puede conducir a patologías, especialmente de tipo metabólico. Investigaciones recientes han logrado vincular una alteración de los contactos RE-mitocondria con resistencia a la insulina [Tubbs *et al.*, 2014], obesidad [Arruda *et al.*, 2014], hipertrofia cardíaca [Gutiérrez *et al.*, 2014b], hipertensión pulmonar [Sutendra *et al.*, 2011], enfermedad de Parkinson [Ottolini *et al.*, 2013] y enfermedad de Alzheimer [Hedskog *et al.*, 2013].

En cuanto a las alteraciones basales que induce Cav1 sobre la fisiología del RE, la topología de Cav1 podría jugar un rol en la forma de este organelo. Es sabido que la curvatura de la membrana del RE es determinada por proteínas en su superficie. Reticulon-4/Nogo, un importante determinante

morfológico del RE, posee 2 dominios citosólicos, y sólo un pequeño segmento luminal [Zurek *et al.*, 2011]. Este tipo de forma, más voluminosa hacia el lado citosólico, favorece la curvatura de la membrana, para evitar impedimentos estéricos entre los dominios de la proteína. Así, la sobreexpresión de Reticulon-4 incrementa la formación de túbulos del RE por sobre las cisternas [Voeltz *et al.*, 2006]. Interesantemente, Cav1 presenta una topología similar a Reticulon-4, con una mayor presencia en el lado citosólico de la membrana, y además, su sobreexpresión ha sido asociada a la formación de túbulos en la membrana celular [Verma *et al.*, 2010]. Por lo tanto, la sobreexpresión de Cav1 realizada en esta tesis podría inducir alteraciones en la morfología del RE, las cuales podrían explicar la alteración en la comunicación RE-mitocondria. Más aún, se ha mostrado que Reticulon-4 es un regulador negativo de la asociación RE-mitocondria [Sutendra *et al.*, 2011], al igual que como se muestra en este trabajo. De esta forma, existe una correlación entre la topología proteica, la morfología del RE y la comunicación entre organelos, lo que abre la posibilidad de que los efectos basales observados por la sobreexpresión de Cav1 se deban a efectos sobre la forma del RE.

Otros resultados de nuestro laboratorio muestran que la UPR frente a estrés del retículo inducido con tunicamicina o hipoxia se reduce la expresión de Cav1 [tesis doctoral de María Inés Díaz]. De hecho, los niveles proteicos de IRE1 $\alpha$  y PERK, dos sensores de la UPR en la superficie del RE, están

disminuidos respecto a las células que no expresan Cav1. De esta forma, ésta constituye otra arista mediante la cual Cav1 merma la respuesta adaptativa celular frente a estrés, disminuyendo así la sobrevivencia celular. En relación a la presente tesis, este nexo Cav1-UPR podría estar asociada con los efectos metabólicos observados. Por un lado, PKA fosforila a IRE1 $\alpha$ , favoreciendo de esta forma su señalización [Mao *et al.*, 2011]. Así, se convierte en un sensor no sólo de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, sino también puede integrar señales de la vía PKA. El hecho de que Cav1 sea un regulador negativo de la señalización de PKA en la superficie del RE podría ser un mecanismo por el que antagoniza con la señalización de la UPR y sería responsable de la ausencia en la fosforilación de JNK observada en este trabajo (Figura 14). Por otro lado, esta acción anti-UPR mediada por Cav1 podría contribuir al malplegamiento proteico, debido a una menor capacidad para mantener la homeostasis proteica. Esta potencial condición de “malplegamiento silencioso” por ausencia de UPR podría ser responsable de la redistribución basal de Calnexina observada en las HeLa Cav1. Para comprobar o refutar esta presunción, una buena alternativa experimental sería medir la formación de agregados proteicos en el RE.

Por último, el efecto negativo de Cav1 sobre la respuesta metabólica celular podría radicarse en una alteración directa en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular, más que en la comunicación RE-mitocondria. Por una parte, se ha

mostrado que la bomba SERCA se ubica en dominios ricos en colesterol en el RE, donde también se ubica Cav1 [Dremina *et al.*, 2006]. Al desplazarse fuera de estos dominios, la actividad de SERCA disminuye drásticamente. En el contexto de esta investigación, la sobreexpresión de Cav1 podría tener un efecto sobre la actividad de SERCA, exacerbando la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  al RE, antagonizando de esta forma la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la mitocondria. Por otra parte, un estudio en células de músculo liso arterial ha reportado que Cav1 asociada a caveolas interactúa con el IP3R y permite su activación en los sitios de contacto entre RE y la membrana plasmática [Adebiyi *et al.*, 2011]. Sin embargo, a la fecha no existen otros reportes de la interacción IP3R-Cav1, ni a nivel de membrana plasmática, ni en RE ni en otros tipos celulares. De este modo, limitado es el conocimiento actual acerca de cómo Cav1 regula la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelularmente. El presente trabajo, en tanto, explora una nueva arista de esta señalización, correspondiente a la comunicación RE-mitocondria. Entonces, más experimentos son necesarios para descifrar los efectos de Cav1 más allá de las caveolas en la membrana plasmática, sino más bien en el interior de la célula.

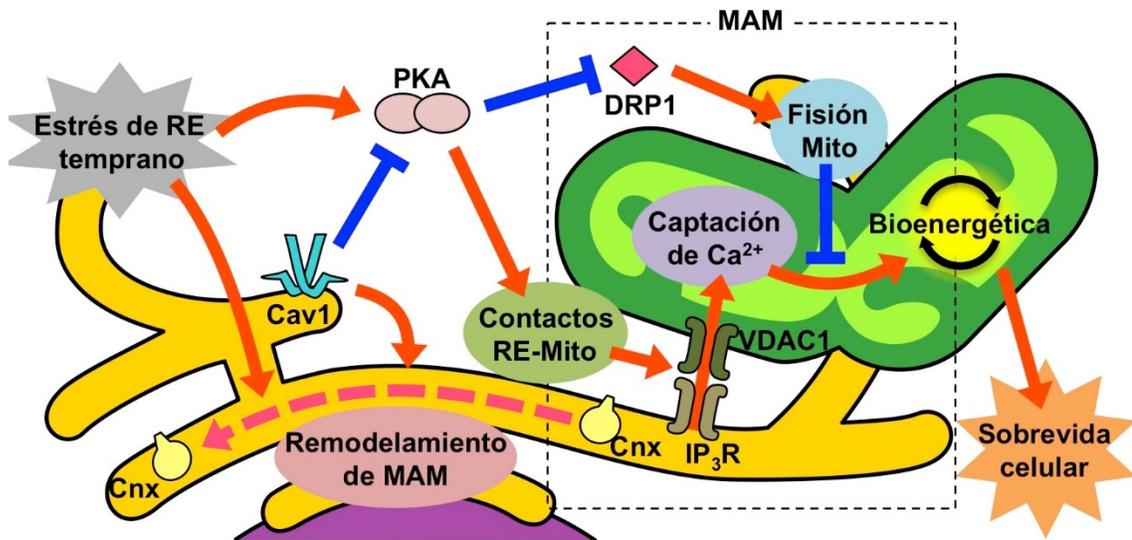
## 7. CONCLUSIONES

PKA actúa como una vía de señalización adaptativa que favorece la comunicación entre organelos frente a condiciones de estrés. Por su parte, AMPK tiene una acción similar a PKA sobre el metabolismo mitocondrial, aunque no participa durante el estrés de RE en el presente modelo de estudio.

Caveolina-1, por su parte, disminuye la plasticidad de los contactos RE-mitocondria, ya que altera la señalización de PKA en la superficie de los organelos. Esta alteración de los contactos RE-mitocondria forma parte del mecanismo por el cual Cav1 afecta la viabilidad celular en células tumorales. Más aún, la expresión de Cav1 disminuye severamente el metabolismo mitocondrial basal, sugiriendo que su presencia genera un *switch* metabólico profundo, asociado con el denominado “efecto Warburg inverso”.

A nivel mecanístico, los principales hallazgos de la presente tesis se encuentran resumidos en el modelo a continuación (Figura 22).

En conclusión, la comunicación entre organelos es un tópico interesante, emergente, y aparentemente, ocupa un rol central en el desarrollo de múltiples patologías crónicas muy prevalente en el mundo de hoy. Más investigaciones son necesarias al respecto para encontrar nuevos blancos terapéuticos, comprender la etiología de las enfermedades y así, mejorar la calidad de la vida humana.



**Figura 22. Caveolina-1 antagoniza a PKA durante la fase temprana del estrés del RE.**

Panel superior: Resumen gráfico. Las células HeLa se adaptan al estrés de RE temprano mediante el incremento de los contactos RE-mitocondria, efecto que es mediado por PKA y antagonizado por Cav1. Panel inferior: Modelo final. El estrés de RE temprano, a través de PKA induce elongación mitocondrial, formación de contactos RE-mitocondria y remodelado de MAM, con la consecuente mantención de la sobrevida celular. Caveolina-1, por su parte, antagoniza con la acción de PKA, inhibiendo la fisión mitocondrial y la formación de contactos, afectando así la sobrevida celular.

## 8. REFERENCIAS

- Adebiyi A, Narayanan D, Jaggar JH. Caveolin-1 assembles type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and canonical transient receptor potential 3 channels into a functional signaling complex in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2011;286:4341-8.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5a ed. New York, Garland Sciences, 2008. 1392p.
- Appenzeller-Herzog C, Hall MN. Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Trends Cell Biol.* 2012;22:274-82.
- Arruda AP, Pers BM, Parlakg l G, G ney E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med.* 2014;20:1427-35.
- Bender FC, Reymond MA, Bron C, Quest AF. Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res.* 2000;60:5870-8.
- Bosch M, Mar  M, Herms A, Fernández A, Fajardo A, Kassan A, Giralt A, Colell A, Balgoma D, Barbero E, González-Moreno E, Matias N, Tebar F, Balsinde J, Camps M, Enrich C, Gross SP, García-Ruiz C, Pérez-Navarro E, Fernández-Checa JC, Pol A. Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr Biol.* 2011;21:681-6.
- Bravo R, Vicencio JM, Parra V, Troncoso R, Munoz JP, Bui M, Quiroga C, Rodriguez AE, Verdejo HE, Ferreira J, Iglewski M, Chiong M, Simmen T, Zorzano A, Hill JA, Rothermel BA, Szabadkai G, Lavandero S. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci.* 2011;124:2143-52.
- Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AF, Lavandero S. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013;301:215-90.
- Bravo-Sagua R, Rodriguez AE, Kuzmicic J, Gutierrez T, Lopez-Crisosto C, Quiroga C, Díaz-Elizondo J, Chiong M, Gillette TG, Rothermel BA, Lavandero S. Cell death and survival through the endoplasmic reticulum-mitochondrial axis. *Curr Mol Med.* 2013;13:317-29.

- Budovskaya YV1, Stephan JS, Reggiori F, Klionsky DJ, Herman PK. The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2004;279:20663-71.
- Bui M, Gilady SY, Fitzsimmons RE, Benson MD, Lynes EM, Gesson K, Alto NM, Strack S, Scott JD, Simmen T. Rab32 modulates apoptosis onset and mitochondria-associated membrane (MAM) properties. *J Biol Chem*. 2010;285:31590-602.
- Cancino J, Capalbo A, Di Campli A, Giannotta M, Rizzo R, Jung JE, Di Martino R, Persico M, Heinklein P, Sallese M, Luini A. Control systems of membrane transport at the interface between the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Dev Cell*. 2014;30:280-94.
- Cárdenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgó J, Müller M, Vais H, Cheung KH, Yang J, Parker I, Thompson CB, Birnbaum MJ, Hallows KR, Fosskett JK. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca<sup>2+</sup> transfer to mitochondria. *Cell*. 2010;142:270-83.
- Chang CR1, Blackstone C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem*. 2007;282:21583-7.
- Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P, Brasaemle DL, Scherer PE, Lisanti MP. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes*. 2004;53:1261-70.
- Cribbs JT, Strack S. Functional characterization of phosphorylation sites in dynamin-related protein 1. *Methods Enzymol*. 2009;457:231-53.
- Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajnóczky G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol*. 2006;174:915-21.
- Darios F, Muriel MP, Khondiker ME, Brice A, Ruberg M. Neurotoxic calcium transfer from endoplasmic reticulum to mitochondria is regulated by cyclin-dependent kinase 5-dependent phosphorylation of tau. *J Neurosci*. 2005;25:4159-68.
- de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 2008;456:605-10.
- de Brito OM, Scorrano L. An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO J*. 2010;29:2715-23.

- Di Benedetto G, Scalzotto E, Mongillo M, Pozzan T. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell Metab.* 2013;17:965-75.
- Díaz J, Mendoza P, Ortiz R, Díaz N, Leyton L, Stupack D, Quest AF, Torres VA. Rab5 is required in metastatic cancer cells for Caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion. *J Cell Sci.* 2014;127:2401-6.
- Dremina ES, Sharov VS, Schöneich C. Displacement of SERCA from SR lipid caveolae-related domains by Bcl-2: a possible mechanism for SERCA inactivation. *Biochemistry.* 2006;45:175-84.
- El-Yazbi AF, Cho WJ, Schulz R, Daniel EE. Caveolin-1 knockout alters beta-adrenoceptors function in mouse small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291:G1020-30.
- Feliciello A, Gottesman ME, Avvedimento EV. cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cell Signal.* 2005;17:279-87.
- Fridolfsson HN, Kawaraguchi Y, Ali SS, Panneerselvam M, Niesman IR, Finley JC, Kellerhals SE, Migita MY, Okada H, Moreno AL, Jennings M, Kidd MW, Bonds JA, Balijepalli RC, Ross RS, Patel PM, Miyanojara A, Chen Q, Lesnefsky EJ, Head BP, Roth DM, Insel PA, Patel HH. Mitochondria-localized caveolin in adaptation to cellular stress and injury. *FASEB J.* 2012;26:4637-49.
- Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science.* 2011;334:358-62.
- Fu A, Eberhard CE, Screatton RA. Role of AMPK in pancreatic beta cell function. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;366:127-34.
- Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol.* 2011;13:589-98.
- Grimm S. The ER-mitochondria interface: the social network of cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823:327-34.
- Gutiérrez T, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Contreras-Ferrat A, Vasquez-Trincado C, Morales PE, Lopez-Crisosto C, Sotomayor-Flores C, Chiong M, Rothermel BA, Lavandero S. Alteration in mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. *Cell Commun Signal.* 2014b;12:68.

- Gutiérrez T, Simmen T. Endoplasmic reticulum chaperones and oxidoreductases: critical regulators of tumor cell survival and immunorecognition. *Front Oncol*. 2014a;4:291.
- Hajnóczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:445-54.
- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 2013;495:389-93.
- Hayashi T, Fujimoto M. Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction. *Mol Pharmacol*. 2010;77:517-28.
- Hedskog L, Pinho CM, Filadi R, Rönnbäck A, Hertwig L, Wiehager B, Larssen P, Gellhaar S, Sandebring A, Westerlund M, Graff C, Winblad B, Galter D, Behbahani H, Pizzo P, Glaser E, Ankarcona M. Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:7916-21.
- Hom JR, Gewandter JS, Michael L, Sheu SS, Yoon Y. Thapsigargin induces biphasic fragmentation of mitochondria through calcium-mediated mitochondrial fission and apoptosis. *J Cell Physiol*. 2007;212:498-508.
- Huang LJ, Wang L, Ma Y, Durick K, Perkins G, Deerinck TJ, Ellisman MH, Taylor SS. NH<sub>2</sub>-Terminal targeting motifs direct dual specificity A-kinase-anchoring protein 1 (D-AKAP1) to either mitochondria or endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 1999;145:951-9.
- Kaufman RJ, Malhotra JD. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:2233-9.
- Kim S, Kim HY, Lee S, Kim SW, Sohn S, Kim K, Cho H. Hepatitis B virus x protein induces perinuclear mitochondrial clustering in microtubule- and Dynein-dependent manners. *J Virol*. 2007;81:1714-26.
- Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science*. 2013;339:464-7.
- Kuznetsov AV, Margreiter R. Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int J Mol Sci*. 2009;10:1911-29.

- Leitman J, Ron E, Ogen-Shtern N, Lederkremer GZ. Compartmentalization of endoplasmic reticulum quality control and ER-associated degradation factors. *DNA Cell Biol.* 2013;32:2-7.
- Liesa M, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev.* 2009;89:799-845.
- Lochner A, Moolman JA. The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006;24:261-74.
- Lui PP, Chan FL, Suen YK, Kwok TT, Kong SK. The nucleus of HeLa cells contains tubular structures for Ca<sup>2+</sup> signaling with the involvement of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308:826-33.
- Lynes EM, Raturi A, Shenkman M, Ortiz Sandoval C, Yap MC, Wu J, Janowicz A, Myhill N, Benson MD, Campbell RE, Berthiaume LG, Lederkremer GZ, Simmen T. Palmitoylation is the switch that assigns calnexin to quality control or ER Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Cell Sci.* 2013;126:3893-903.
- Mao T, Shao M, Qiu Y, Huang J, Zhang Y, Song B, Wang Q, Jiang L, Liu Y, Han JD, Cao P, Li J, Gao X, Rui L, Qi L, Li W, Liu Y. PKA phosphorylation couples hepatic inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  to glucagon signaling in glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:15852-7.
- Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol.* 2014;41:195-216.
- Mavrakis M, Lippincott-Schwartz J, Stratakis CA, Bossis I. Depletion of type IA regulatory subunit (RI $\alpha$ ) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. *Hum Mol Genet.* 2006;15:2962-71.
- Mavrakis M, Lippincott-Schwartz J, Stratakis CA, Bossis I. mTOR kinase and the regulatory subunit of protein kinase A (PRKAR1A) spatially and functionally interact during autophagosome maturation. *Autophagy.* 2007;3:151-3.
- Morales PE, Torres G, Sotomayor-Flores C, Peña-Oyarzún D, Rivera-Mejías P, Paredes F, Chiong M. GLP-1 promotes mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446:410-6.
- Myhill N, Lynes EM, Nanji JA, Blagoveshchenskaya AD, Fei H, Carmine Simmen K, Cooper TJ, Thomas G, Simmen T. The subcellular distribution of calnexin is mediated by PACS-2. *Mol Biol Cell.* 2008;19:2777-88.
- Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol.* 2014;4C:6-13.

- Nicholls DG, Ferguson SJ. Bioenergetics 4<sup>th</sup> ed. 2013 Academic Press, London.
- Ottolini D, Cali T, Negro A, Brini M. The Parkinson disease-related protein DJ-1 counteracts mitochondrial impairment induced by the tumour suppressor protein p53 by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria tethering. *Hum Mol Genet.* 2013;22:2152-68.
- Pavrides S, Tsirigos A, Vera I, Flomenberg N, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Loss of stromal caveolin-1 leads to oxidative stress, mimics hypoxia and drives inflammation in the tumor microenvironment, conferring the "reverse Warburg effect": a transcriptional informatics analysis with validation. *Cell Cycle.* 2010;9:2201-19.
- Peng L, Men X, Zhang W, Wang H, Xu S, Xu M, Xu Y, Yang W, Lou J. Dynamin-related protein 1 is implicated in endoplasmic reticulum stress-induced pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis. *Int J Mol Med.* 2011;28:161-9.
- Perl M, Chung C, Ayala A. Apoptosis. *Crit Care Med.* 2005;33:S526-9.
- Porporato PE, Payen VL, Pérez-Escuredo J, De Saedeleer CJ, Danhier P, Copetti T, Dhup S, Tardy M, Vazeille T, Bouzin C, Feron O, Michiels C, Gallez B, Sonveaux P. A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep.* 2014;8:754-66.
- Quest AF, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med.* 2008;12:1130-50.
- Razani B, Rubin CS, Lisanti MP. Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem.* 1999;274:26353-60.
- Razani B, Lisanti MP. Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281:C1241-50.
- Rimessi A, Marchi S, Patergnani S, Pinton P. H-Ras-driven tumoral maintenance is sustained through caveolin-1-dependent alterations in calcium signaling. *Oncogene.* 2014;33:2329-40.
- Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, Gijzen KA, Sellink E, van Mourik JA, Fernandez-Borja M, Voorberg J. Dynein-dynactin complex mediates protein kinase A-dependent clustering of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:49-55.
- Rowland AA1, Voeltz GK. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:607-25.

- Simmen T, Lynes EM, Gesson K, Thomas G. Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: tight links to the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta*. 2010;1798:1465-73.
- Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, Pestell RG, Lisanti MP. Understanding the Warburg effect and the prognostic value of stromal caveolin-1 as a marker of a lethal tumor microenvironment. *Breast Cancer Res*. 2011;13:213.
- Steegborn C. Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases - similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842:2535-2547.
- Sutendra G, Dromparis P, Wright P, Bonnet S, Haromy A, Hao Z, McMurtry MS, Michalak M, Vance JE, Sessa WC, Michelakis ED. The role of Nogo and the mitochondria-endoplasmic reticulum unit in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*. 2011;3:88ra55.
- Szabadkai G, Simoni AM, Chami M, Wieckowski MR, Youle RJ, Rizzuto R. Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca<sup>2+</sup> waves and protects against Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2004;16:59-68.
- Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *J Cell Biol*. 2006;175:901-11.
- Takano K, Tabata Y, Kitao Y, Murakami R, Suzuki H, Yamada M, Inuma M, Yoneda Y, Ogawa S, Hori O. Methoxyflavones protect cells against endoplasmic reticulum stress and neurotoxin. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C353-61.
- Tubbs E, Theurey P, Vial G, Bendridi N, Bravard A, Chauvin MA, Ji-Cao J, Zoulim F, Bartosch B, Ovize M, Vidal H, Rieusset J. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes*. 2014;63:3279-94.
- Varadi A, Johnson-Cadwell LI, Cirulli V, Yoon Y, Allan VJ, Rutter GA. Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci*. 2004;117:4389-400.
- Verma P, Ostermeyer-Fay AG, Brown DA. Caveolin-1 induces formation of membrane tubules that sense actomyosin tension and are inhibited by polymerase I and transcript release factor/cavin-1. *Mol Biol Cell*. 2010;21:2226-40.

- Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*. 2006;124:573-86.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123:309-14.
- Wikstrom JD, Israeli T, Bachar-Wikstrom E, Swisa A, Ariav Y, Waiss M, Kaganovich D, Dor Y, Cerasi E, Leibowitz G. AMPK regulates ER morphology and function in stressed pancreatic  $\beta$ -cells via phosphorylation of DRP1. *Mol Endocrinol*. 2013;27:1706-23.
- Xu C1, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*. 2005;115:2656-64.
- Yi M, Weaver D, Hajnóczky G. Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol*. 2004;167:661-72.
- Zhou W, Chen KH, Cao W, Zeng J, Liao H, Zhao L, Guo X. Mutation of the protein kinase A phosphorylation site influences the anti-proliferative activity of mitofusin 2. *Atherosclerosis*. 2010;21:216-23.
- Zurek N, Sparks L, Voeltz G. Reticulon short hairpin transmembrane domains are used to shape ER tubules. *Traffic*. 2011;12:28-41.