

NIX ES REQUERIDA PARA LA MITOFAGIA INDUCIDA POR HEMINA

Betiana Nebaí Salassa (1,2), Rubén Grosso (1), María Isabel Colombo (1), Claudio Fader Kaiser (1,2).

(1) Instituto de Histología y Embriología de Mendoza IHEM- Conicet, Mendoza, Argentina.

(2) Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina.

bnsalassa@gmail.com

La autofagia, es considerada como un mecanismo por el cual macromoléculas citosólicas e incluso organelas enteras son transportadas a los lisosomas para su degradación. Este proceso comienza con la prolongación de membranas especializadas del retículo endoplasmático (membrana de aislamiento) que envuelven parte del citoplasma y organelas, y que al entrar en contacto sus extremos y fusionarse, forma el autofagosoma, el cual termina fusionándose con el lisosoma para degradar su contenido. Estudios, tanto en levaduras como en mamíferos permitieron la caracterización de al menos 30 genes *Atg* los cuales son requeridos en la autofagia [1]. Uno de ellos es la proteína citosólica LC3/*Atg8*, la cual se la ha encontrado asociada a la membrana interna y externa de estructuras autofagosomales, por lo que es un buen marcador de autofagosomas. La hematopoyesis es un proceso a través del cual las células hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes. Durante este proceso se produce la maduración de los precursores eritroides, dentro de los que se incluyen los reticulocitos. Es importante tener en cuenta que los reticulocitos sufren una extensiva remodelación de sus membranas, disminución del volumen y eliminación de organelas membranosas, mitocondrias y ribosomas, lo cual asegura su función celular crítica. Aproximadamente el 30% de la hemoglobina es producida en el reticulocito y como el grupo hem es sintetizado en la mitocondria, éste es el posible motivo por lo que esta organela es prácticamente la última en ser eliminada. Varios trabajos han demostrado la importancia de la autofagia en la maduración de algunos tipos celulares, como los reticulocitos, donde son secuestradas organelas como mitocondrias para evitar la liberación de citocromo C que podrían llevar a la apoptosis a estas células. Las células K562 son una línea celular derivada de un paciente con leucemia mieloide crónica, por lo que tienen características eritroides. Esta línea celular ha sido muy usada como modelo de diferenciación por hemina, quien induce la eritropoyesis. La estimulación de la maduración de las células K562, por algunos compuestos, produce un aumento de los niveles de hemoglobina fetal. Nuestros resultados muestran que frente a distintos inductores de maduración como lo son la hidroxiurea, la hemina, un ester de forbol (PMA) o butirato de sodio, el estímulo con hemina fue el más marcado en estas células. Para determinar si los inductores de maduración inducen la autofagia, decidimos determinar por microscopía confocal la distribución de las proteínas LC3 en células K562 GFP-LC3. Sorprendentemente observamos que el tratamiento con hemina generó un agrandamiento de vesículas autofágicas decoradas con GFP-LC3. Para estudiar los posibles cambios moleculares que puede sufrir la proteína LC3 en presencia de un estímulo de maduración, se realizó un Western blot de un lisado de células K562. Como resultado se obtuvo que en aquellas células que fueron incubadas en presencia de hemina presentaron un aumento de la proteína LC3 total, así como un aumento de la relación de LC3II/tubulina, indicando una estimulación del flujo autofágico. Durante la eritropoyesis, ciertas organelas como las mitocondrias deben ser eliminadas. Nosotros hemos observado que en células estables para GFP-LC3, las cuales fueron estimuladas con hemina y marcadas las mitocondrias con mitotracker rojo, hubo un aumento del número de mitocondrias adentro de autofagosomas. El estudio ultraestructural por microscopía electrónica nos permitió observar este efecto y pudimos observar que la hemina produciría el secuestro de las mitocondrias por parte de membranas de aislamiento provenientes del retículo y llevaría, finalmente, a su degradación en estructuras de doble membrana correspondientes a autofagosomas como se observa en la Figura 1A. Además ante la estimulación con hemina, las mitocondrias se encontraban en compartimentos ácidos y degradativos (Figura 1B). Esto se midió mediante la incubación de las células con una albumina auto-apagada (DQ-BSA), la cual solo fluoresce cuando es degradada en los lisosomas. Trabajos recientes han demostrado que la proteína NIX (perteneciente a la familia de las Bcl-2) es requerida para dirigir las mitocondrias al interior del autofagosoma para su degradación [2]. Nosotros observamos, que es necesaria la presencia de NIX para que se produzca la mitofagia inducida por hemina, ya que hay una marcada disminución de la cantidad de mitocondrias atrapadas dentro de autofagosomas en células que sobreexpresan la mutante negativa de NIX o en células transfectadas con un siRNA contra la proteína NIX como se observa en la Figura 2. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la estimulación de los mecanismos de maduración eritroide, por un compuesto natural como es la hemina, es capaz de estimular la síntesis de hemoglobina e inducir una respuesta autofágica en células K562. Esta respuesta genera el

4° Congreso de la Asociación Argentina de Microscopía (SAMIC 2016)

secuestro de mitocondrias dentro de los autofagosomas, mediado por la proteína NIX, los cuales finalmente se fusionan con los compartimentos lisosomales para degradar el material contenido en su interior. Nosotros creemos que la inducción de este mecanismo llevaría a una maduración más rápida y eficiente.

REFERENCIAS

- [1] Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T., (2002) "Autophagosome formation in mammalian cells" *Cell Struct Funct* 27(6):421-9.
 [2] Sandoval H, et al. (2008) "Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells" *Nature* 10;454(7201):232-5.

FIGURAS

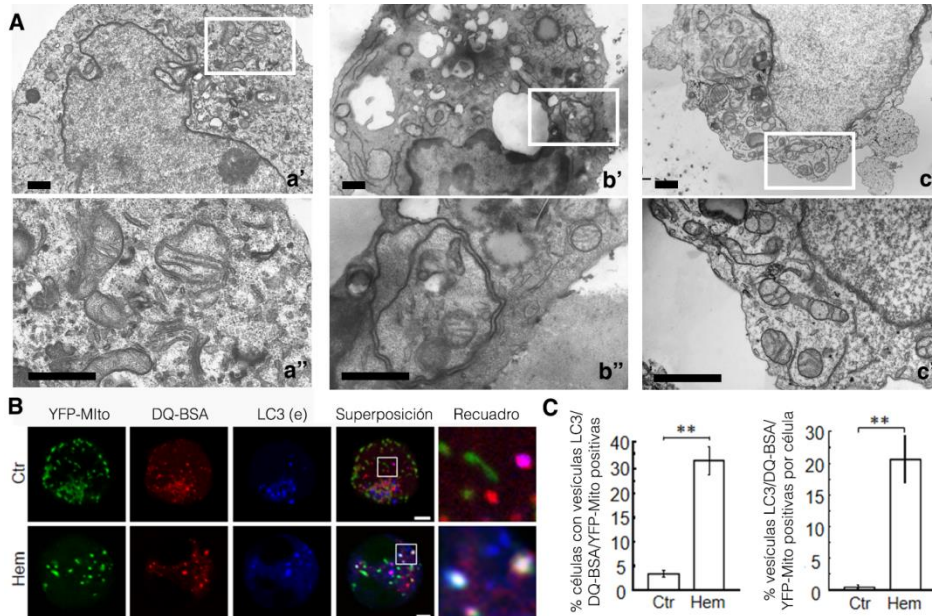


Figura 1. Hemina induce mitofagia. A) Las células K562 se incubaron en condiciones control (a') o con hemina durante 5 días (b', c') y se analizaron por TEM. En las sometidas a hemina puede observarse, envolviendo a mitocondrias intactas, una doble membrana que correspondería a un autofagosoma (b', b'') y una estructura que se correspondería con una membrana de aislamiento, la que luego podría formar un autofagosoma (c', c''). En las células control se observan estructuras citoplasmáticas intactas y conservadas (a', a''). Barra= 1µm. B) Células K562 que sobreexpresaban YFP-Mito, fueron incubadas por 12 horas con DQ-BSA, y anteriormente durante 5 días, sin (Ctr) o con hemina (Hem). En las células fijadas detectamos LC3 endógena por inmunofluorescencia indirecta. Las imágenes representan un plano confocal simple. Barra= 5µm. C) Cuantificaciones de porcentaje células con vesículas LC3, YFP-Mito y DQ-BSA positivas; y porcentaje de vesículas LC3, YFP-Mito y DQ-BSA positivas por célula.

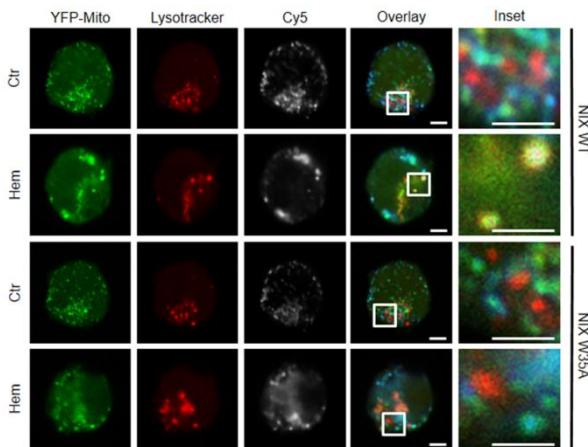


Figura 2. La sobreexpresión de la mutante negativa de NIX produce una disminución de la degradación mitocondrial vía lisosomal. Células K562 que sobreexpresaban YFP-Mito junto con Flag-NIX o la mutante Flag-NIX W35A, fueron incubadas en ausencia (Ctr) o presencia de hemina (Hem). Las estructuras lisosomales se observan en rojo marcadas por lysotracker y NIX pudo ser visualizada por Inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti Flag CY5. Las imágenes representan un plano confocal simple. Barra = 5 µm