



**UNIVERSIDAD  
SAN SEBASTIÁN**

**UNIVERSIDAD SAN SEBASTIÁN**

**FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIA**

**CENTRO DE BIOLOGÍA CELULAR Y BIOMEDICINA**

**FUNCIÓN DE LA ONCOPROTEÍNA GOLPH3 EN LA INTERFASE**

**APARATO DE GOLGI-MITOCONDRIA**

**Tesis presentada para obtener el grado académico de Doctor en Biología**

**Celular y Biomedicina**

**Tutor: Dr. Cheril C. Tapia Rojas**

**Co-Tutor: Gonzalo A. Mardones Cofré**

**Estudiante: Catalina A. Meléndez Polanco**

© Catalina Andrea Meléndez Polanco

**Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, como condición de incluir la cita bibliográfica del documento.**

**Santiago, Chile**

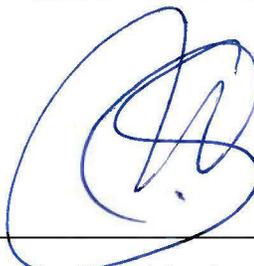
**2023**

## EVALUACIÓN

En Santiago, el 19 de diciembre de 2023 los abajo firmantes dejan constancia que la estudiante Catalina Andrea Meléndez Polanco, del programa de Doctorado en Biología Celular y Biomedicina, ha aprobado la tesis para optar al grado de Doctor en Biología Celular y Biomedicina con una nota de 7,0 (siete coma cero).



Dra. Cheril Tapia Rojas  
Directora de Tesis  
Universidad San Sebastián



Dr. Gonzalo Mardones Cofré  
Codirector de Tesis  
Universidad San Sebastián



J. Cesar Cardenas (Dec 22, 2023 09:25 GMT-3)

Dr. Julio César Cárdenas Matus  
Miembro Comisión de Tesis  
Universidad Mayor



Dr. Jorge Cancino Henríquez  
Miembro Comisión de Tesis  
Universidad San Sebastián



Dr. Alfonso González de la Rosa  
Miembro Comisión de Tesis  
Universidad San Sebastián

## FINANCIAMIENTO

Catalina Andrea Meléndez Polanco fue financiada por la beca para estudiantes de programas de doctorado de la Vicerrectoría de Investigación y Doctorados de la Universidad San Sebastián, Chile.

Esta tesis fue financiada por:

- Proyecto FONDECYT 1221178 de la Dra Cheril Tapia Rojas.
- Centro Ciencia & Vida, FB210008, Financiamiento Basal para Centros Científicos y Tecnológicos de Excelencia de ANID de la Doctora Cheril Tapia Rojas.
- Proyecto FONDECYT 1211481 del Dr. Gonzalo Mardones Cofré.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a la Universidad San Sebastián y al Centro de Biología Celular y Biomedicina por entregarme los espacios y financiamiento necesarios para realizar esta tesis doctoral.

Agradezco a mis tutores, la Dra Cheril Tapia y al Dr Gonzalo Mardones, por el constante apoyo académico y financiero durante este proceso. A mis compañeros de la primera generación de este programa de doctorado, cohorte 2017, por el ánimo, las risas, las salidas, las lecturas de papers y los mini proyectos. A mi mejor amiga Nicolle, por todo el aguante, la llamadas por teléfono a cualquier hora del día, gracias por ser incondicional. A mi amigo Darío, que a pesar de vernos poco, siempre está ahí. A mis amigas que conocí en el CEBICEM, a la Belén, la Elo y Cristina, por las risas, las salidas, las conversaciones y el constante apoyo. A Javier, Nuria, Pascuala, Javi, Kapi y Diego, gracias por siempre estar ahí. A la Vivi, por el constante apoyo, tanto experimental como teórico, por todo lo discutido de GOLPH3, las salidas y las risas, gracias Vivi!. A Tomás, por siempre escucharme y estar ahí. A la Gaby y a la Cony, por las constantes llamadas de teléfono, consejos, o por simplemente escuchar. A amigos que de alguna manera perdimos contacto durante todo este proceso, pero que igual fueron parte de mi vida y formación, gracias!

Agradezco a mi familia, por el constante apoyo, a mi mamá, a la Nela, a mis primos Marco, Dani y Coke, gracias por todo el apoyo. A la Yaya, por preocuparse de que me comiera toda la comida, siempre estás en mi mente y en mi corazón. A mi perro Luca, por el constante apoyo psicológico.

Al profesor Manuel Varas, por el constante apoyo académico y psicológico y por todas las conversaciones e invitaciones a tomar café, gracias profes!. En general, a todos los profesores que contribuyeron en mi formación, a la profe Andrea Soza, Jorge Cancino, Claudio Retamal, Alfonso González, Alejandro Godoy, a la profesora Patricia Burgos, por su apoyo durante todo el periodo de realización de esta tesis, por sus críticas constructivas y por sus consejos, gracias profe!. A Don Javier, que sin él, hubiese sido imposible la realización de esta tesis.

Agradecer a todas las personas del CEBICEM que contribuyeron de alguna u otra forma, tanto psicológica, como profesionalmente a la Cata del presente.  
Muchas gracias!

Finalmente a mi pareja, por el constante apoyo, aguante, por las noches de estudio, las salidas, las risas, los perritos, por alimentarme, gracia por todo mi amor!

Muchas gracias a todos!

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
2.1	APARATO DE GOLGI (AG) .....	11
2.2	MITOCONDRIA .....	12
2.2.1	<i>Fosforilación oxidativa</i> .....	13
2.2.2	<i>Fisión y fusión mitocondrial</i> .....	14
2.2.3	<i>Biogénesis mitocondrial</i> .....	16
2.2.4	<i>Mitofagia</i> .....	17
2.3	GOLPH3 .....	19
2.3.1	<i>GOLPH3: ¿conexión entre AG y mitocondria?</i> .....	22
2.4	PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN .....	23
2.4.1	<i>Hipótesis</i> .....	24
2.4.2	<i>Objetivo general</i> .....	24
2.4.3	<i>Objetivos específicos</i> .....	24
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1	ANTICUERPOS .....	25
3.2	CULTIVO CELULAR .....	26
3.3	GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES UTILIZANDO PARTÍCULAS LENTIVIRALES .....	26
3.4	EXTRACTOS DE PROTEÍNAS, SDS-PAGE, WESTERN BLOT Y ANÁLISIS DE CUANTIFICACIÓN DENSITOMÉTRICA. ....	28
3.5	MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ATP .....	29
3.6	MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ATP .....	29
3.7	MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE ROS CELULAR .....	29
3.8	MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL .....	30
3.9	MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA PINK1 RELACIONADA CON LA MITOFAGIA .....	31
3.10	MEDICIONES DE MASA Y ADN MITOCONDRIAL .....	31
3.11	ANÁLISIS CUALITATIVO DE MITOCONDRIAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET) .....	32
3.12	MEDICIÓN DE CONSUMO DE OXÍGENO .....	32

3.13	ENSAYO DE <i>LIVE CELL IMAGING</i> .....	33
3.14	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
4.1	GOLPH3 Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN LA FISIÓN MITOCONDRIAL .....	34
4.2	LA DEPLECIÓN DE GOLPH3 EN CÉLULAS MDA-MB-231 PROMUEVE LA FRAGMENTACIÓN DE LA RED MITOCONDRIAL SIN CAMBIOS PROTEICOS ASOCIADOS A FISIÓN Y FUSIÓN.....	38
4.3	LA AUSENCIA DE GOLPH3 EN CÉLULAS MDA-MB-231 REDUCE LA FUNCIÓN BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL CON UN AUMENTO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	42
4.4	CÉLULAS MDA-MB-231 DEPLETADAS DE GOLPH3 PRESENTAN UN AUMENTO EN LOS NIVELES DE PINK1.....	46
4.5	CÉLULAS MDA-MB-231 DELEACIONADAS DE GOLPH3 PRESENTAN UN AUMENTO DE LOS NIVELES DE PGC1- $\alpha$ SIN CAMBIOS EN LA MASA MITOCONDRIAL.....	49
4.6	GOLPH3 LOCALIZADO EN EL CITOSOL GENERA UNA RED MITOCONDRIAL INTERCONECTADA CON UNA DISTRIBUCIÓN HACIA LA ZONA PERINUCLEAR.....	53
4.7	LA EXPRESIÓN DE MUTANTES DE GOLPH3 QUE NO SE LOCALIZAN EN EL AG CAMBIA LA RED MITOCONDRIAL Y LA ULTRAESTRUCTURA MITOCONDRIA.....	59
4.8	CÉLULAS MDA-MB-231 DEPLETADAS DE GOLPH3 Y RESCATADAS CON LAS DISTINTAS VERSIONES DE GOLPH3 MUESTRAN DIFERENTES CAMBIOS EN LA FUNCIÓN BIOENERGÉTICA DE LA MITOCONDRIA.....	63
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>69</b>
5.1	GOLPH3 Y SU POSIBLE FUNCIÓN EN LA FISIÓN MITOCONDRIAL.....	69
5.2	LA DEPLECIÓN DE GOLPH3 EN CÉLULAS MDA-MB-231 PROMUEVE LA FRAGMENTACIÓN DE LA RED MITOCONDRIAL SIN CAMBIOS PROTEICOS ASOCIADAS A FISIÓN Y FUSIÓN.....	71
5.3	LA AUSENCIA DE GOLPH3 EN CÉLULAS MDA-MB-231 REDUCE LA FUNCIÓN BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL CON UN AUMENTO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	74
5.4	EL POOL CITOSÓLICO DE GOLPH3 GENERA UNA RED MITOCONDRIAL INTERCONECTADA CON UNA DISTRIBUCIÓN HACIA LA ZONA PERINUCLEAR.....	78
5.5	LA EXPRESIÓN DE GOLPH3 EN EL CITOSOL REDUCE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL INDUCIDA POR LA AUSENCIA DE GOLPH3.....	79
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>PROYECCIONES</b> .....	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>MODELO PROPUESTO</b> .....	<b>86</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Potencial electrostático de superficie de la estructura cristalográfica de golph3 (código PDB 3KN1) y los mutantes R90L y R171A/R174L obtenida a través del programa PYMOL.....	21
figura 2. GFP-GOLPH3 se localiza en los sitios de fisión mitocondrial después de la llegada de YFP-DRP11 .....	37
Figura 3. Células depletadas de GOLPH3 tienen una red mitocondrial con menor volumen y mayor número de mitocondrias, pero sin cambios en los niveles de proteínas de fisión y fusión mitocondrial.. .....	39
Figura 4. Las células MDA-GOLPH3-KO presentan una disminución en la función bioenergética mitocondrial con un aumento de ROS.....	42
Figura 5. Células MDA-GOLPH3-KO presentan cambios significativo en los niveles de PINK1, comparadas con las MDA-WT.. .....	46
Figura 6. Células MDA-GOLPH3-KO presentan un aumento en los niveles dePGC1- $\alpha$ , sin cambios en la masa ni en la cantidad de adn mitocondrial.....	49
Figura 7. La variante GFP-GOLPH3-R90L muestra un patrón de localización citosólico, comparado con GFP-GOLPH3-WT que se observa un patrón perinuclear consistente con AG.....	52
Figura 8. Células MDA-GOLPH3-KO rescatadas con GFP-GOLPH3-R90L presentan mitocondrias con una localización perinuclear. ....	54
Figura 9. Rescate con las distintas versiones de GOLPH3 sobre la línea MDA-GOLPH3-KO.....	56
Figura 10. Células MDA-GOLPH3-KO rescatadas con las distintas variantes de GOLPH3 presentan un cambio en la distribución y tamaño de las mitocondrias. .	58
Figura 11. Células MDA-MB-231 depletadas de GOLPH3 y rescatadas con las distintas versiones muestran cambios en la integridad de las membranas mitocondriales, electrodensidad y función bioenergética.. .....	63
Figura 12. Modelo propuesto.....	85

## 1 RESUMEN

Dentro de la célula existen diversas formas de comunicación, dentro de las cuales se encuentran el tráfico vesicular o a través de sitios de contactos entre el mismo organelo o con otro organelo diferente. Para que ocurran estos tipos de comunicación se necesita de la participación de diversos actores moleculares, como son las proteínas. Una de las comunicaciones menos conocidas es la del aparato de Golgi (AG) con las mitocondrias. Existen diversos estudios que muestran que existe una comunicación funcional entre estos dos organelos, en donde se ha observado, por ejemplo, que vesículas que contienen fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) participan en la última etapa de la fisión mitocondrial, colocalizando con la proteína DRP1, la cual es clave para generar la constricción y dividir a las mitocondrias. Otro estudio mostró una yuxtaposición del AG con las mitocondrias en células que fueron sometidas a altas concentraciones de calcio. Sin embargo, hasta la fecha se desconocen los actores moleculares que podrían estar mediando esta comunicación. En esta tesis se propone a GOLPH3 como un candidato clave para la comunicación AG-mitocondria. GOLPH3/MIDAS/GPP34 es una proteína del AG que también se localiza en el citosol. Evidencia experimental sugiere que GOLPH3 se asocia con la cara *trans* del AG a través de la interacción con PI4P. Diferentes estudios muestran que los niveles de GOLPH3 están aumentados en diferentes tipos de tumores, incluido el de mama. Hasta la fecha, se desconoce la función específica que cumple GOLPH3. Sin embargo, un estudio del año 2005 sugirió un efecto de GOLPH3 sobre la masa mitocondrial a través de la síntesis de lípidos, específicamente cardiolipina, un lípido específico de la mitocondria. Se desconoce cómo GOLPH3 podría desempeñar un papel en las mitocondrias, y si para ello GOLPH3 debe estar localizado en el AG o en el citosol. Los estudios de nuestro laboratorio respaldan la hipótesis de que GOLPH3 podría modular la función y morfología mitocondrial. Específicamente, se observó que células de cáncer de mama depletadas de GOLPH3 (MDA-GOLPH3-KO) presentan una disminución en el contenido y producción de adenosín trifosfato (ATP), un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un aumento en los niveles de PGC1- $\alpha$ , posiblemente

como un mecanismo compensatorio sobre la disfunción mitocondrial. Todo esto acompañado de mitocondrias fragmentadas y un aumento en los niveles de PINK1.

Sin embargo, se desconoce cómo GOLPH3 podría estar mediando todos estos procesos en la mitocondria. Como existe evidencia experimental que vesículas que contienen PI4P provenientes del AG participan en el último paso de la fisión mitocondrial, y cómo GOLPH3 interactúa con PI4P, se estudió si GOLPH3 también pudiese estar participando en este proceso. Sorprendentemente, nuestros análisis de *live cell imaging* mostraron que GOLPH3 se localiza en los sitios de fisión mitocondrial después de la llegada de DRP1, posiblemente participando en este proceso. Además, se desconoce qué pool de GOLPH3 sería responsable del fenotipo mitocondrial observado. En base a esto, se estudió el efecto de la localización de GOLPH3 en la función mitocondrial. Para alterar la localización de GOLPH3 en el AG, se usó una forma mutada de GOLPH3 (GOLPH3-R90L) que con un cambio aminoacídico altera su interacción con PI4P en el AG, localizando a GOLPH3 solamente en el citosol. Sorprendentemente, las células MDA-GOLPH3-KO transfectadas con esta versión mostraron una distribución de las mitocondrias en la zona perinuclear, un fenotipo mitocondrial diferente al observado en las células MDA-WT y MDA-GOLPH3-KO, y una disminución del contenido de ATP. En resumen, los datos mostrados indican que tanto la ausencia de GOLPH3 como la no asociación de esta proteína con el AG generan un efecto negativo en la función y la red mitocondrial. Este estudio es de gran interés, ya que GOLPH3 podría tener un papel en la comunicación AG-mitocondria.

## 2 INTRODUCCIÓN

Las células establecen comunicación y reciben señales tanto de células vecinas como del entorno circundante. Estas señales se transmiten y decodifican, proporcionando información sobre el entorno extracelular. Posteriormente, esta información se transmite a efectores moleculares río abajo, permitiendo regular su estado fisiológico en respuesta a los cambios ambientales (Sarkar et al., 2023).

Para que exista un correcto funcionamiento dentro de la célula, se necesita de un trabajo coordinado de los organelos. En base a esto, muchos organelos se comunican entre sí (Sarkar et al., 2023) y a la fecha, hay tres formas principales de comunicación intracelular: tráfico vesicular, difusión de moléculas y sitios de contacto. Estas últimas son áreas de proximidad (cercanas a 10 nm) entre dos organelos, donde no se genera una fusión de sus membranas. Estos contactos permiten a los organelos controlar, por ejemplo, el flujo de lípidos, proteínas y metabolitos (David et al., 2021). Hasta la fecha, se ha descrito que existe comunicación entre la mayoría de los organelos. Sin embargo, una de las menos exploradas es la comunicación del AG (David et al., 2021). La conexión más caracterizada del AG es con el retículo endoplasmático (RE), que tiene una amplia comunicación para garantizar la síntesis y homeostasis de muchas biomoléculas (David et al., 2021). Uno de los eventos que ocurren, por ejemplo, es la transferencia de ceramida, que se sintetiza en el RE y luego se transfiere al *trans*-Golgi para su maduración a esfingolípidos complejos. Esta transferencia de ceramida puede ocurrir a través del transporte vesicular, o directamente al *trans*-Golgi a través de contactos (Funato & Riezman, 2001). Pero, independiente del tipo de comunicación, ya sea a través de vesículas o mediante contactos, son las proteínas las que median esta comunicación entre los distintos organelos. Hay diversas proteínas descritas que participan, las cuales se pueden clasificar de acuerdo a su función, como proteínas estructurales, de reclutamiento, reguladoras, como anclaje, entre otras (Scorrano et al., 2019).

Una de las comunicaciones entre organelos menos conocida es entre el AG con las mitocondrias. Hasta la fecha, la función de esta interacción no está muy clara, pero autores han observado, por ejemplo, una interacción funcional entre AG y mitocondrias en células acinares pancreáticas y la importancia de esta ubicación para el establecimiento de gradientes de calcio en el AG (Dolman et al., 2005). Otro estudio mostró una posible interacción AG-mitocondria durante la fisión mitocondrial. En este último trabajo, los autores describen que vesículas que contienen PI4P provenientes del *trans*-Golgi viajan a los sitios de fisión mitocondrial. Si bien no se conoce su función, los autores observan que estas vesículas llegan después de DRP1, por lo que podrían estar participando en el último paso de la fisión mitocondrial (Nagashima et al., 2020). Seguido a esta publicación científica, otros autores mostraron que las vesículas que contenían PI4P podrían contribuir de manera sinérgica a DRP1 con la polimerización de actina en el proceso de fisión mitocondrial (Duan et al., 2023).

Aunque se ha descrito que existe comunicación entre mitocondrias y el AG (Dolman et al., 2005; Duan et al., 2023; Nagashima et al., 2020), no está muy claro cuál es su función o qué actores moleculares podrían estar participando en esta. Por esto último, aunque existe evidencia que sugiere una comunicación entre estos dos organelos, no se ha descrito ninguna proteína que participara en esto. Por esta razón, esta tesis se centró en estudiar una posible comunicación entre el AG y las mitocondrias, proponiendo a la proteína GOLPH3 como una proteína clave para la comunicación funcional AG-mitocondria. Antes de introducir a GOLPH3, se hablará sobre las características y funciones que se conocen de cada organelo.

## 2.1 Aparato de Golgi (AG)

El aparato de Golgi (AG), que fue descubierto en 1898 por el anatomista italiano Camillo Golgi (Mazzarello et al., 2009), consiste en una pila de cisternas que están polarizadas. La cara *cis*, que recibe cargos del retículo endoplásmico (ER), las cisternas de la zona medial, la cara *trans* por donde también pasan los cargos modificándolos, y la red *trans*-Golgi (TGN) cuya función en parte está relacionada con la clasificación de cargas lipídicas y proteicas para su posterior exportación a

su destino final (Makhoul et al., 2019). Sin embargo, esta organización puede variar entre organismos. En vertebrados, durante la interfase, las pilas individuales de Golgi se conectan por túbulos membranosos generando una estructura en forma de cinta compacta que se encuentra cerca del centro organizador de microtúbulos (MTOC) (Wei & Seemann, 2017). En contraste, en plantas, moscas y hongos, las pilas de Golgi están dispersas por todo el citoplasma (Xiang & Wang, 2011).

Se ha postulado que la correcta organización y funcionamiento del AG depende de proteínas que serían parte de una matriz de Golgi, entre ellas las proteínas del apilamiento del reensamblaje del Golgi (GRASP) (X. Zhang & Wang, 2016) y las denominadas golginas (Barr & Short, 2003; Kulkarni-Gosavi et al., 2019). Estas se encuentran localizadas entre las cisternas del AG o entre las cisternas y las vesículas (Kulkarni-Gosavi et al., 2019). Como el *trans*-Golgi se encuentra enriquecido de PI4P, existen otras proteínas importantes que interactúan con el AG a través de su dominio de homología a pleckstrina (PH), que a su vez interactúan con PI4P (Levine & Munro, 2002). Además, existen otras proteínas que no tienen este dominio, pero que interactúan con el PI4P del *trans*-Golgi mediante interacciones electrostáticas (Wood et al., 2009).

El AG tiene dos funciones más conocidas; la primera es la generación de modificaciones post-traduccionales de cargos por enzimas residentes del AG, como glicosiltransferasas, glucosidasas, quinasas, entre otras (Liu et al., 2021). Estas modificaciones se producen en todas las cisternas del AG; las enzimas ocupan diferentes ubicaciones, lo que es esencial para garantizar una correcta modificación post-traduccional secuencial (Liu et al., 2021). La segunda función es la clasificación, empaquetamiento, destino y reciclaje de los cargos modificados a destinos celulares apropiados (Rios & Bornens, 2003).

## 2.2 Mitocondria

Las mitocondrias son organelos multifuncionales que en muchas células forman una red que se mantiene mediante un equilibrio entre la fisión, fusión, la biogénesis mitocondrial y la mitofagia. La función más conocida de las mitocondrias

es la producción de ATP por la oxidación de sustratos orgánicos en condiciones aeróbicas a través de la fosforilación oxidativa (Herst et al., 2017). Todos estos procesos mencionados son importantes para que las mitocondrias tengan un funcionamiento correcto. Estos se describirán con más detalle a continuación.

### 2.2.1 Fosforilación oxidativa

Una de las funciones más importantes de las mitocondrias es la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Los componentes de la cadena transportadora de electrones (complejos I-V) se encuentran en la membrana mitocondrial interna. Estos complejos están formados por múltiples subunidades que trabajan en conjunto para crear un gradiente electroquímico de protones que es utilizado por la ATP sintasa (complejo V) para la producción de ATP (Chaban et al., 2014).

OXPHOS es una serie de reacciones de oxidación-reducción que implica la transferencia de electrones de NADH y FADH<sub>2</sub> al oxígeno a través de la cadena transportadora de electrones (ETC). Además, OXPHOS utiliza oxígeno como agente oxidante final (y aceptor de electrones) (Ojas A. Deshpande & Shamim S. Mohiuddin, 2021). El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), que es generado por las bombas de protones de los complejos I, III y IV, y el gradiente de protones ( $\Delta pH$ ) se utilizan para producir ATP por la ATP sintasa (Zorova et al., 2018)

Cuando las mitocondrias son disfuncionales, la producción de ATP disminuye, y en algunas ocasiones también el  $\Delta\Psi_m$ .  $\Delta\Psi_m$  también juega un papel clave en la homeostasis mitocondrial a través de la eliminación selectiva de mitocondrias disfuncionales (Zorova et al., 2018). Cuando la ETC funciona de manera incorrecta, las mitocondrias pueden generar mayores cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS). El aumento de la producción de ROS causa daño oxidativo en muchas patologías ocasionando también señalización redox retrógrada desde el organelo hasta el citosol y el núcleo (Murphy, 2009). Esto ocurre cuando los electrones desapareados escapan de OXPHOS y reaccionan con el oxígeno, generando anión superóxido ( $O^{2-}$ ), el cual puede reaccionar con el ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y lípidos, generando reacciones oxidativas

que pueden conducir a mutaciones y carcinogénesis (Andrés Juan et al., 2021; St-Pierre et al., 2006).

Algunos de los eventos claves para el buen funcionamiento de las mitocondrias son la fusión y la fisión mitocondrial. La fusión ayuda a mitigar el estrés al fusionar el contenido de las mitocondrias no funcionales con las funcionales. La fisión es importante para la formación de nuevas mitocondrias, contribuye al control de calidad mediante la eliminación de mitocondrias dañadas, y puede facilitar la apoptosis. La alteración de estos eventos conduce a diversas patologías (Youle & Van Der Bliek, 2012).

### 2.2.2 Fisión y fusión mitocondrial

Los procesos de fisión y fusión mitocondrial están mediados por una familia de proteínas guanosina trifosfatasa (GTPasas) cuyo miembro más conocido es la proteína dinamina (Antonny et al., 2016). La fisión mitocondrial está mediada por DRP1, un miembro de la familia de proteínas citosólicas relacionadas con dinamina. DRP1 se recluta desde el citosol hasta la membrana mitocondrial externa. Esto depende de su fosforilación en el residuo de serina 616, para luego formar un anillo alrededor de la mitocondria que genera una constricción para fisión de las membranas mitocondriales (Van der Bliek et al., 2013). La fisión mitocondrial es importante para segregar las mitocondrias más dañadas y eliminarlas para preservar el correcto estado de la red mitocondrial. Además, es importante para regular la morfología mitocondrial y para facilitar el tráfico de las mitocondrias (Youle & Van Der Bliek, 2012). Existen otros tipos de fisión mitocondrial que son independientes de la función de DRP1. Por ejemplo, se ha observado que el receptor de EGF (EGFR) puede traslocarse hacia la membrana externa mitocondrial, interactuar con mitofusina 1 (MFN1) y así aumentar la fisión mitocondrial. Esta interacción interfiere con la función de MFN1, aumentando así la fisión mitocondrial (Che et al., 2015). En el caso de la fusión, la unión de la membrana externa mitocondrial entre dos mitocondrias está mediada por los miembros de la familia de la dinamina MFN1 y mitofusina 2 (MFN2). En mamíferos, la fusión entre membranas internas de dos mitocondrias está mediada por otro

miembro de la familia de la dinamina, la proteína OPA1 (Song et al., 2007). La fusión mitocondrial es importante, por ejemplo, cuando una mitocondria se encuentra defectuosa funcionalmente; esta puede fusionarse con otra mitocondria en la misma célula para compensar sus defectos rescatando su función (Westermann, 2010).

Tanto para la fisión como para la fusión mitocondrial se ha descrito la participación de diversos organelos. En el caso de la fisión mitocondrial, se ha postulado que al inicio participa el retículo endoplasmático (RE) marcando y generando la primera constricción del túbulo mitocondrial que se va a fisionar (Friedman et al., 2011). También se ha sugerido que el lisosoma participa después de la constricción mediada por el RE, transfiriendo PI4P y mediado por un mecanismo dependiente de Rab7-GTP (Boutry & Kim, 2021; Wong et al., 2018). Para el último paso de la fisión mitocondrial se ha sugerido también la función del AG a través de la transferencia de vesículas que contienen PI4P, vesículas que se localizan en el túbulo mitocondrial que se va a fisionar después del reclutamiento de DRP1 (Nagashima et al., 2020). Se ha propuesto que estas vesículas que contienen PI4P provenientes del AG cooperan con filamentos de actina, contribuyendo a su polimerización, regulando así la fisión mitocondrial (Duan et al., 2023). Sin embargo, hasta la fecha no se conoce la función que podría tener PI4P durante la fisión mitocondrial o si la membrana mitocondrial contiene un pool de PIP4 en estado estacionario, sólo se ha descrito la presencia de fosfatidilinositol, el precursor de PI4P (Pemberton et al., 2020). En cuanto a la fusión mitocondrial, al igual que en la fisión, se ha observado que el RE también puede tener una función. Autores han observado que proteínas de la maquinaria de fusión mitocondrial, como son las mitofusinas, se acumulan en sitios de contacto entre RE-mitocondria, sitios donde posteriormente ocurre fusión mitocondrial (Abrisch et al., 2020). Faltan estudios para definir si existen otros organelos involucrados en los eventos de fusión mitocondrial.

En general, tanto la fisión como la fusión mitocondrial son procesos altamente dinámicos, que se encargan de equilibrar dos procesos: compensación del daño por fusión y eliminación del daño por fisión mitocondrial (Youle & Van Der Bliek, 2012). Además, se han observado eventos de fisión en células que son altamente

metastásicas. Por ejemplo, en estudios en células de cáncer de pulmón se ha observado que la fisión mitocondrial provoca cambios en la distribución subcelular mitocondrial y la producción de ATP, aumentando la progresión y metástasis de este tipo celular (Che et al., 2015). Por lo tanto, estos procesos no solo se encargan de compensar el daño y la eliminación de mitocondrias dañadas, sino que además puede ser un evento que ayude a la célula cancerígena a migrar e invadir, proporcionándole ATP en lugares donde la célula lo requiera (Zhao et al., 2013). A pesar de que los eventos de fisión y fusión mitocondrial están involucrados en mantener un equilibrio de mitocondrias dañadas (por fusión) o eliminarlas (por fisión), estos eventos dependen de otros procesos, como la biogénesis mitocondrial y la mitofagia, con el fin de eliminar las mitocondrias dañadas y compensar esta eliminación restableciendo la masa mitocondrial. Estos procesos se describen a continuación.

### 2.2.3 Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial se puede definir como el crecimiento y la división de mitocondrias preexistentes que tienen su propio genoma y pueden autorreplicarse. Las proteínas mitocondriales están codificadas por los genomas nuclear y mitocondrial (Jornayvaz & Shulman, 2010). El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular de ADN que tiene su propio sistema de transcripción/traducción, con 2 genes de ARN ribosómico (ARNr) y 22 genes de ARN de transferencia (ARNt), y que codifica para 13 subunidades proteicas de la cadena transportadora de electrones (7 proteínas del complejo I, 1 proteína del complejo III, 3 proteínas del complejo IV y 2 proteínas del complejo V) (Calvo & Mootha, 2010). Tiene una región no codificante, el D-loop, que contiene el origen de la replicación del ADNmt y el sitio de iniciación de la transcripción (Clayton, 2000).

El regulador maestro de la biogénesis mitocondrial es la proteína PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha) (Gureev et al., 2019; Piantadosi & Suliman, 2006; Scarpulla, 2011). Este es un coactivador transcripcional que cuando se trasloca al núcleo puede activar a los factores respiratorios nucleares 1 y 2 (NRF1 y NRF2), los cuales regulan la expresión de las

subunidades de la ETC codificadas por el genoma nuclear y se unen a los promotores de genes involucrados en la transcripción (Gureev et al., 2019; Piantadosi & Suliman, 2006; Scarpulla, 2011). PGC-1 $\alpha$  puede ser regulado tanto a nivel transcripcional como post-traduccionales (Fernandez-Marcos & Auwerx, 2011). La proteína quinasa A (PKA) activa a CREB (cAMP responsive element binding protein 1) aumentando la expresión de PGC-1 $\alpha$  (Herzig S et al., 2001). p38 MAPK es otro factor que regula la expresión de PGC-1 $\alpha$  (Gureev et al., 2019). En el caso de las modificaciones post-traduccionales, se ha descrito que PGC1- $\alpha$  puede ser regulado por fosforilación, en donde, dependiendo del sitio de fosforilación, puede activar (serina 538 o treonina 177) o inhibir su función (serina 570) (Chenxia Hu et al., 2017; Jä et al., 2007); por ubiquitinación, mediante su degradación por el proteasoma (Olson et al., 2008); por acetilación, en donde se ha observado tener un efecto inhibitorio (Cantó et al., 2009; El-Khamisy et al., 2005; Gerhart-Hines et al., 2007), entre otros.

PGC1- $\alpha$  no solo está involucrado en la biogénesis mitocondrial, sino que además regula genes asociados a la respuesta antioxidante. Se ha visto que puede aumentar los niveles de las enzimas superóxido dismutasa manganeso (MnSOD/SOD2), catalasa, peroxiredoxina 5 y 3 (Prx5 y Prx3) y tioredoxina reductasa 2 (TRXR) (Valle et al., 2005). También se ha observado en células de cáncer de melanoma una sobreexpresión de PGC1- $\alpha$ , un aumento en el metabolismo energético mitocondrial y un aumento en la respuesta antioxidante que permite que las células sobrevivan bajo condiciones de estrés oxidativo (Vazquez et al., 2013).

#### 2.2.4 Mitofagia

La mitofagia es un proceso celular que elimina selectivamente las mitocondrias dañadas a través del secuestro de las mitocondrias para su posterior degradación lisosomal (K. Ma et al., 2020).

En células de mamíferos, la vía más estudiada es la que involucra a la proteína quinasa 1 inducida por PTEN (PINK1) y a la ubiquitina E3 ligasa Parkina. En condiciones fisiológicas y con potencial de membrana mitocondrial normal,

PINK1 es importada y proteolizada en la membrana interna mitocondrial por la proteasa presenilina asociada a romboidal (PARL) y por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) en la matriz mitocondrial. Luego es retrotranslocada al citosol para ser degradada por el proteasoma (Vives-Bauza et al., 2010). Por otro lado, cuando la mitocondria se encuentra con el potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) disminuído, PINK1 se estabiliza, permaneciendo localizada en la membrana mitocondrial externa. El dominio con actividad quinasa, que se encuentra ubicado hacia el citoplasma, fosforila a Parkina en la serina 65, promoviendo su translocación desde el citosol a la membrana externa de la mitocondria (Ashrafi & Schwarz, 2013). Luego, Parkina ubiquitina proteínas de la membrana externa mitocondrial, como MFN1 y MFN2, causando su degradación por el proteasoma (Ashrafi & Schwarz, 2013). Esta pérdida de las mitofusinas conduce al aumento de la fragmentación mitocondrial, en donde Parkina continúa ubiquitinando otros sustratos de la membrana externa mitocondrial que son reconocidos por el receptor de autofagia p62 (Ashrafi & Schwarz, 2013). Los receptores de mitofagia se caracterizan por la presencia de al menos una región de interacción con LC3 (LIR), que puede unirse directamente al mediador de autofagia LC3 para reclutar autofosomas a las mitocondrias dañadas, que luego se fusionan con el lisosoma donde la mitocondria finalmente se degrada (Kane et al., 2014; Padman et al., 2019; Rogov et al., 2017; Terradas et al., 2021).

En resumen, los organelos dentro de las células están en constante comunicación. Esta comunicación depende de diversos actores moleculares, como las proteínas. Dentro de la comunicación AG-mitocondria, se desconoce cuál podría ser su función y qué proteínas podrían estar participando. En esta tesis se propone a la proteína GOLPH3 como una proteína clave en la comunicación AG-mitocondria y para la función de esta. Primero hablaremos de las características generales de esta proteína y después antecedentes que muestran a GOLPH3 como una buena candidata para esta comunicación AG-mitocondria.

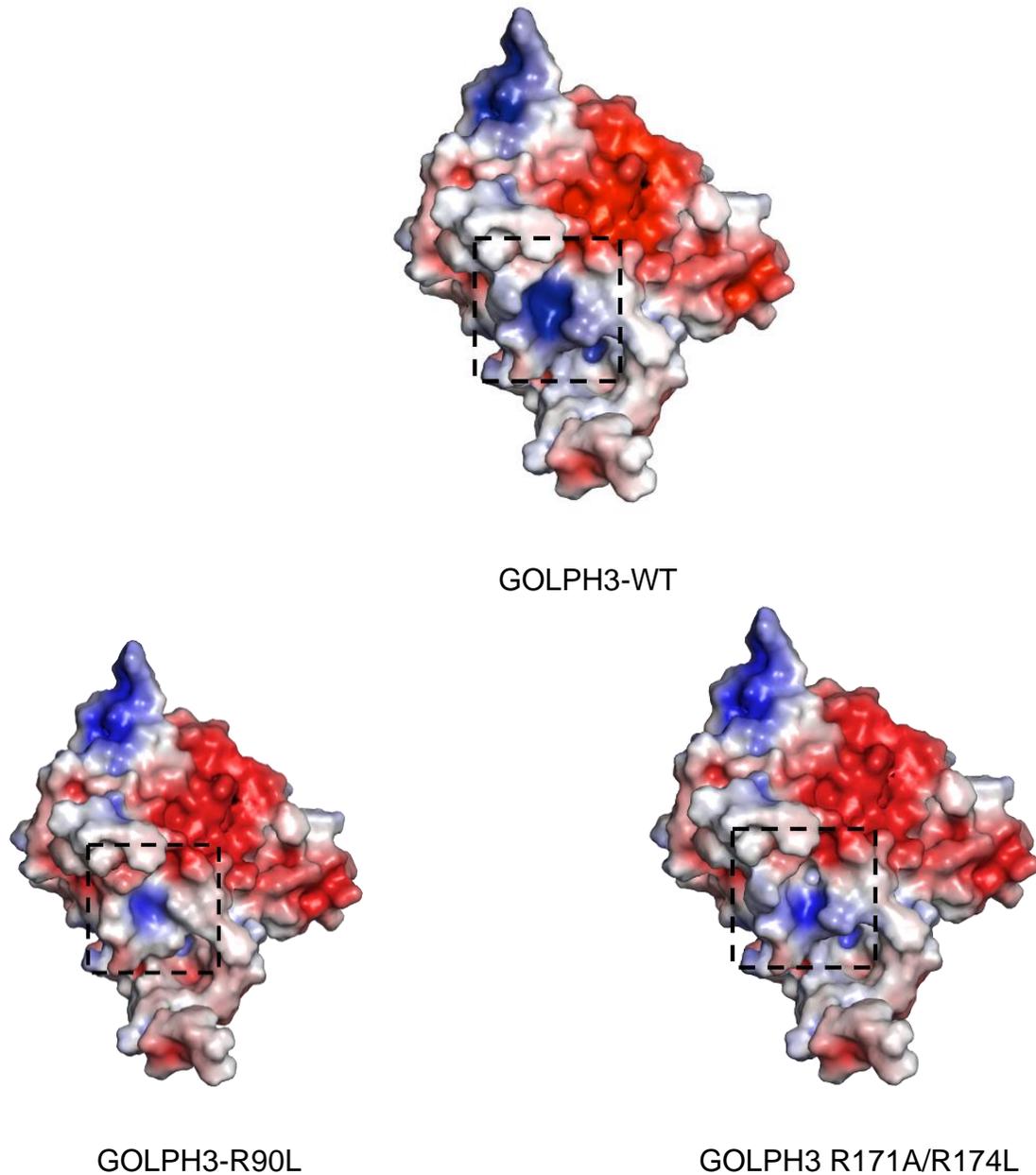
### 2.3 GOLPH3

GOLPH3 ha sido descrita como una proteína periférica del AG, pero que además se encuentra localizada en el citosol (Snyder et al., 2006; Wu et al., 2000). Se postula que su localización en el *trans*-Golgi se debe a la interacción de ciertos residuos aminoácidos de GOLPH3 con los fosfatos del PI4P (Figura 1), lípido que se encuentra enriquecido en el *trans*-Golgi (Wood et al., 2009). Los estudios han demostrado que al mutar estos residuos, de arginina 90 a leucina (R90L) y arginina 171 a alanina en conjunto con arginina 174 a leucina (R171A/R174L), se pierde la localización de GOLPH3 en el AG, localizando a GOLPH3 solo en el citosol (Dippold et al., 2009).

GOLPH3 se encuentra sobreexpresada en muchos tipos de tumores, incluyendo pulmón, próstata, mama, entre otros (Hua et al., 2012; Kunigou et al., 2011; Li et al., 2011; Y. Ma et al., 2014; Peng et al., 2014; Sechi et al., n.d.; Tang et al., 2018; L. J. Zhang et al., 2014). En los seres humanos, el gen que codifica para GOLPH3 se encuentra en el cromosoma 5p13 en una región que se amplifica en muchos tipos de tumores. En pacientes con cáncer, los niveles de expresión de GOLPH3 se correlacionan con un pobre pronóstico (Xue et al., 2014). Además, se ha visto que el *knock-down* de GOLPH3 en distintas líneas celulares de cáncer disminuye el crecimiento de las células, disminuyendo la proliferación celular en células que sobreexpresan GOLPH3, y que su sobreexpresión genera la transformación de líneas celulares primarias que poseen una baja expresión de GOLPH3, potenciando la proliferación, el crecimiento independiente de anclaje y crecimiento tumoral del xenoinjerto (Scott et al., 2009). Por todo esto, GOLPH3 se ha definido como una oncoproteína asociada al AG (Scott et al., 2009; Sechi et al., n.d.).

Hasta la fecha, la función específica de GOLPH3 no está completamente dilucidada, pero se ha descrito que podría participar en el mantenimiento de la estructura del AG (Dippold et al., 2009; Taft et al., 2013), en el mantenimiento de la localización de algunas glicosiltransferasas localizadas en el AG (Ali et al., 2012;

Isaji et al., 2014; Pereira et al., 2014), en el tráfico anterógrado desde el AG hacia la membrana plasmática (Dippold et al., 2009), entre otras funciones.



**Figura 1. Potencial electrostático de superficie de la estructura cristalográfica de GOLPH3 (código pdb 3KN1) y los mutantes R90L y R171A/R174L obtenida a través del programa Pymol.**

El marco muestra el posible sitio de interacción de ciertos residuos básicos de aminoácidos de GOLPH3 (R90, R171/R174) con el PI4P del *trans*-Golgi y cómo cambia su basicidad cuando estos residuos son mutados por lisina (L) o alanina (A). En rojo: aminoácidos ácidos; en azul: aminoácidos básicos.

Un estudio mostró en diferentes líneas celulares de cáncer de mama utilizando ensayos de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueamiento (FRAP) que GOLPH3 es una proteína altamente dinámica que cicla entre el *trans*-Golgi y el citosol (Tenorio et al., 2016). Hasta la fecha, la función de GOLPH3 en el citosol se desconoce, pero se han descrito diversas interacciones de GOLPH3 con proteínas citosólicas, como con prohibitina 1 y 2 (PHB1 y PHB2) (Wang et al., 2021).

### 2.3.1 GOLPH3: ¿conexión entre AG y mitocondria?

Aunque GOLPH3 es una proteína periférica del AG y que posee un pool citosólico (Dippold et al., 2009; Snyder et al., 2006; Wu et al., 2000), se le ha atribuido un efecto sobre las mitocondrias. En 2005, Nakashima y sus colaboradores demostraron que el *knock-down* de GOLPH3 en células HeLa genera una disminución de la masa mitocondrial. Por el contrario, al sobreexpresar GOLPH3 la masa mitocondrial aumenta. Esto fue observado mediante incubaciones con marcadores mitocondriales utilizando microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica. Los autores concluyen que GOLPH3 está involucrado en la síntesis de cardiolipina, un lípido específico de las mitocondrias (Nakashima-Kamimura et al., 2005). Sin embargo, los autores no estudiaron si la reducción en la expresión de GOLPH3 podría estar alterando la función bioenergética u otra función mitocondrial. Tampoco se estudió qué pasaría en ausencia de GOLPH3, si tuviese otras funciones relacionadas con la morfología mitocondrial o la bioenergética, o si esto estuviese ocurriendo en otras líneas celulares.

Además, otro estudio relaciona al AG con las mitocondrias, donde vesículas enriquecidas de PI4P provenientes del *trans*-Golgi se localizan en sitios de fisión marcados por DRP1 (Nagashima et al., 2020). La función que tendrían estas vesículas en la fisión mitocondrial no está clara, pero podría ser que durante la fisión

se necesite de PI4P, o que PI4P sea llevado para traer otras proteínas efectoras hacia la fisión mitocondrial. Tomando en cuenta que GOLPH3 interacciona con PI4P del *trans*-Golgi, podría ser un candidato para ser llevado hacia los sitios de fisión mitocondrial, y cumplir alguna función.

#### 2.4 Propuesta de investigación

En base a los antecedentes que sugieren que GOLPH3 podría tener un papel en las mitocondrias en células HeLa, y en base a que hasta la fecha hay muy pocos estudios que relacionan a GOLPH3 con las mitocondrias, desconociéndose los mecanismos e interactores que podrían estar mediando esta comunicación, se generó la pregunta de ¿qué pasaría con las mitocondrias en una línea celular depletada (*knock-out*) de GOLPH3?: ¿se verán afectadas la función bioenergética de las mitocondrias y la morfología de la red mitocondrial en ausencia de GOLPH3?. Responder estas preguntas podría sugerirnos un posible mecanismo por el cual GOLPH3 regula la estructura y función de las mitocondrias.

Como GOLPH3 es una proteína que recicla entre el AG y el citosol, y se desconoce cuál pool es el que podría tener una función en las mitocondrias, además surge la pregunta de ¿qué pasaría con la función y morfología de las mitocondrias localizando a GOLPH3 solo en el citosol?

**A partir de estas preguntas se generó la siguiente hipótesis:**

#### 2.4.1 Hipótesis

“GOLPH3 y su distribución entre el AG y el citosol controlan la morfología y función de las mitocondrias”

#### 2.4.2 Objetivo general

Estudiar la contribución de GOLPH3 a la morfología y función mitocondrial

#### 2.4.3 Objetivos específicos

1- Determinar el efecto de la ausencia de GOLPH3 sobre la morfología y función de las mitocondrias.

2- Determinar la contribución del pool citosólico de GOLPH3 en la morfología y función de las mitocondrias.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: ratón anti- $\beta$ -Actina (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EE.UU, dilución 1:5000 para western blot), ratón anti-DRP1 (sc-271583, Santa Cruz Biotechnology, Inc, dilución 1:1000 usada para western blot), conejo anti-Fosfo-DRP1 (Ser-616, D9A1, #4494, Cell Signaling, dilución 1:1000 usada para western blot), ratón anti-MFN1 (D-10, sc-166644, Santa Cruz Biotechnology, Inc, dilución 1:1000 usada para western blot), ratón anti-PINK1 (C-3, sc-518052, Santa Cruz Biotechnology, Inc, dilución 1:1000 usada para western blot), ratón anti-PGC1- $\alpha$  (4A8, sc-517380, Santa Cruz Biotechnology, Inc, dilución 1:1000 usada para western blot) y ratón anti-TOM20 (F-10, sc-17764, Santa Cruz Biotechnology, Inc, dilución 1:500 usada para western blot). Se utilizaron los siguientes anticuerpos policlonales: conejo anti-GOLPH3 (Abcam; #ab98023, dilución 1:1000 usada para western blot y 1:500 para inmunofluorescencia), conejo anti-OPA1 (PA1-16991, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU, dilución 1:1000 usada para western blot), conejo anti-MFN1 (H-65) (sc-50330, Santa Cruz Biotechnology, Inc, dilución 1:1000 usada para western blot), conejo anti-LC3A/B (#4108, Cell Signaling, dilución 1:1000 usada para western blot). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Prod #31460, Invitrogen, dilución 1:5000), ratón conjugado con HRP (Prod #31430, Invitrogen, dilución 1:5000). Los anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia fueron Alexa conjugados con fluoróforos (Alexa-488, Alexa-555 y Alexa-594), obtenidos de Thermo Fisher Scientific.

### 3.2 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 cultivada en medio Eagle modificado por Dulbecco: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM/F-12, REF 12400-016, Gibco), suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (Biowest, South America, S1810-500-B) inactivado a 55 °C por 20 minutos, y suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Pen-Strep, 15140-122, Gibco), en una incubadora con ambiente húmedo y 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

### 3.3 Generación de líneas celulares estables utilizando partículas lentivirales

Antes de la producción de las partículas lentivirales, se realizó el subclonamiento del ADN complementario (ADNc) de las variantes de GOLPH3 desde los vectores pEGFP-GOLPH3-WT (Tenorio et al., 2016) y pEGFP-GOLPH3-R90L (generado por mutagénesis sitio dirigida a partir de pEGFP-GOLPH3-WT) al vector lentiviral pLVX-IRES-PURO, utilizando los sitios de restricción entre *SaI* y *EcoRI*, generando los vectores pLVX-IRES-PURO-GOLPH3-WT y pLVX-IRES-PURO-GOLPH3-R90L, respectivamente. El subclonamiento se verificó mediante secuenciación con el equipo ABI PRISM 3500 xl Applied Biosystems (Unidad de secuenciación Pontificia Universidad Católica de Chile). A la empresa GenScript Biotech Corporation (Nueva Jersey, Estados Unidos) se le solicitó la mutagénesis sitio dirigida del vector pLVX-IRES-PURO-GOLPH3-WT para generar el vector pLVX-IRES-PURO-GOLPH3-R171A/R174L.

La producción de partículas lentivirales se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Manuel Varas (Laboratorio de biología celular del cáncer, CEBICEM, Universidad San Sebastián). El primer día se sembraron 3x10<sup>6</sup> células HEK293T en una placa de 100 mm en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM 1X REF 10-013-CM, Corning), suplementado con 10% de suero fetal

bovino, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (MEM, NEAA, REF 11140-050, Gibco), 1% de pen-strep y 500 µg/ml de geneticina (REF 10131-035, Gibco). Las células se dejaron crecer en una incubadora con 5% (v/v) CO<sub>2</sub> a 37 °C. Al día siguiente se cambió el medio por medio fresco y después de 4 horas se inició la transfección con cloruro de calcio 0.25 M, tampón HBS 2X (HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM, dextrosa 12 mM, pH 7.1). Los vectores transfectados fueron los siguientes: 8 µg del vector de transferencia de genes pLVX-IRES-PURO vacío, 8 µg de pLVX-IRES-PURO-GOLPH3-WT, 8 µg de pLVX-IRES-PURO-GOLPH3-R90L, o 8 µg de pLVX-IRES-PURO-GOLPH3-R171A/R174L, 4 µg del vector de envoltura pCMV-VSVG y 8 µg del vector de empaquetamiento pSPAX2. Después de 17 horas de la transfección, los medios celulares fueron reemplazados por Opti-MEM fresco (REF 31985-070, gibco) sin suero y con pen-strep al 1%. Después de 60 horas de la transfección, el medio que contenía las partículas lentivirales se cosechó y centrifugó a 1000 rpm (centrífuga KUBOTA 5400, rotor RS-720) durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró a través de filtros de pirinola de 0.45 µm. Finalmente, las partículas lentivirales se concentraron por ultracentrifugación a 100000 x g (rotor P28S) durante 1.5 horas a 4 °C en centrífuga orbital P28S Hitachi. Las partículas lentivirales fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 (Cat N° SH30255.02, Hyclone) sin suero ni antibióticos, y se dejaron en agitación en un rotor orbital a 4 °C durante al menos 2 horas. Las partículas lentivirales fueron tituladas determinando el título lentiviral mediante la limitación del recuento de dilución de colonias.

Luego, células depletadas de GOLPH3 mediante Crispr-Cas9 (MDA-MB-231-GOLPH3-KO), que fueron generadas previamente (Cavieres et al., manuscrito en preparación), fueron transducidas con las diferentes partículas lentivirales producidas. Después de 48 horas, el medio se cambió a medio D-MEM/F-12 suplementado como se mencionó anteriormente. Las células se seleccionaron manteniéndose con puomicina 2 µg/ml. De esta forma se obtuvieron las líneas estables del control, que corresponde al vector vacío MDA-MB-231-KO-LV-vacío (LV-vacío), MDA-MB-231-KO-LV-GOLPH3-WT (LV-WT), MDA-MB-231-KO-LV-

GOLPH3-R90L (LV-R90L) y MDA-MB-231-KO-LV-GOLPH3-R171A/R174L (LV-DM).

#### 3.4 Extractos de proteínas, SDS-PAGE, western blot y análisis de cuantificación densitométrica.

Las células fueron lavadas 3 veces con solución de tampón de fosfato salino (PBS) frío y fueron lisaron en tampón Tritón (Tris 50 mM, NaCl<sub>2</sub> 150 mM, EDTA 1 mM y Tritón X-100 1%, pH 7.5) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasa (número de catálogo 78429, Thermo Fisher Scientific) e inhibidores de fosfatasas (NaF 1 mM, Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). Los extractos fueron centrifugados a 4 °C durante 20 minutos a 14.000 x g. Los sobrenadantes fueron recolectados y se cuantificó la concentración de proteína utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (cat #23225, Thermo Fisher Scientific). Los extractos de proteínas fueron desnaturalizados a 95 °C durante 5 minutos y se resolvieron mediante SDS-PAGE, seguido de western blot en membranas de PVDF o nitrocelulosa. Finalmente, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C, después las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS 1X con Tween-20 0.1%, e incubadas con anticuerpos secundarios por 1 hora. Luego, fueron visualizadas utilizando el kit ECL (sustrato Luminata Forte Western GRP, Millipore). Las bandas de proteínas fueron cuantificadas utilizando la versión 1.53 del software Image J. Para cada condición la cuantificación se hizo a partir de al menos tres experimentos independientes para garantizar un análisis estadístico adecuado.

### 3.5 Medición de la concentración de ATP

La concentración de ATP fue medida con un kit de ensayo de bioluminiscencia de luciferina/luciferasa (kit de determinación de ATP # A22066, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) como se describió anteriormente (Jara et al., 2018). La cantidad de ATP en cada muestra se calculó a partir de curvas estándar y se normalizó a la concentración total de proteínas.

### 3.6 Medición de la producción de ATP

Las líneas celulares fueron homogeneizadas con tampón MSH (manitol 230 mM, sacarosa 70 mM, HEPES 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) suplementado con inhibidores de fosfatasas y un cóctel de inhibidores de proteasas (número de catálogo 78429, Thermo Fisher Scientific). Los lisados fueron obtenidos como se describió en Torres et al., 2021 (Torres et al., 2021). Luego, la fracción enriquecida de mitocondrias fue incubada con los sustratos oxidativos piruvato 5 mM y malato 2.5 mM y se evaluó en el sobrenadante como se describió en Torres et al., 2021 (Torres et al., 2021) utilizando un kit de ensayo de bioluminiscencia luciferina/luciferasa (kit de determinación de ATP N°. A22066, Molecular Probes, Invitrogen).

### 3.7 Medición del contenido de ROS celular

El contenido de ROS se midió utilizando CM-H2DCFDA 2.5  $\mu$ M (DCF) (longitud de onda de excitación 485 nm, y longitud de onda de emisión 530 nm) en el lector de placas Synergy HTX multi-mode reader, Biotek como ha sido descrito anteriormente (Olesen et al., 2020). Se analizó la fluorescencia máxima de cada muestra restando la fluorescencia obtenida de la muestra en blanco.

### 3.8 Morfología mitocondrial

Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta, lavando las células crecidas en cubreobjetos de vidrio 3 veces con PBS que contenía CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM (calcium chloride solution 1 M, 21225-100ML, Sigma) y MgCl<sub>2</sub> 1 mM (MgCl<sub>2</sub> 1 M AM9530G, invitrogen) (CM). Las células se fijaron por 1 hora con paraformaldehído al 4% (Paraformaldehyde 16%, Electron Microscopy Sciences, Cat #15710). Las células se lavaron 3 veces con PBS-CM, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,3% durante 15 minutos y se bloquearon con gelatina al 0.5% en PBS-CM durante 10 minutos. Se utilizó el anticuerpo primario anti-TOM20 (dilución 1:500) durante 1 hora y secundario durante 30 minutos (dilución 1:500, anti-mouse Alexa 488). Los cubreobjetos de vidrio se montaron sobre portaobjetos de vidrio con medio de montaje fluoromount-G (Cat #17984-25, Electron Microscopy Sciences).

Para analizar las zonas donde se localizan las mitocondrias, se cuantificó la zona perinuclear y central de al menos 40 células mediante el programa ImageJ. Para esto, se hicieron distintos círculos que comenzaron desde el núcleo, luego otro círculo en la zona perinuclear y finalmente otro círculo en la periferia (considerado zona central). Se obtuvo la intensidad de fluorescencia (RawIntDen) de cada círculo que posteriormente fue restada para cada círculo, con el fin de obtener solo la intensidad de fluorescencia correspondiente a cada zona.

Para el análisis de morfología mitocondrial, las imágenes se obtuvieron en 16 bits en z-stack con un microscopio confocal Leica TCS SP8. La intensidad de fluorescencia de las imágenes fue cuantificada utilizando el plugin 3D Object Counter de Image J, versión 1.53f51v (Wayne Rasband, NIH, <http://imagej.nih.gov>). El volumen de mitocondrias ( $\mu\text{m}^3$ ) y el número de objetos (equivalente al número de mitocondrias por célula) se obtuvieron de al menos 20 células con el protocolo obtenido de Parra y sus colaboradores (Parra et al., 2008). El número y el volumen de cada mitocondria fue normalizado con el área de cada célula.

### 3.9 Medición de los niveles de la proteína PINK1 relacionada con la mitofagia

Para la medición de la mitofagia, se realizó el ensayo de western blot siguiendo el protocolo antes mencionado, pero correlacionando los niveles de PINK1 y LC3I/LC3II. Como control para inducir la mitofagia, se utilizó carbonilcánido-p-trifluorometoxifenilhidrazona 10  $\mu$ M (FCCP, C2920-10MG, Sigma) durante 3 horas, y para detener el flujo de autofagia se utilizó bafilomicina A1 (sc-201550, Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora.

Las bandas de proteínas fueron cuantificadas utilizando ImageJ (versión software 1.53). Las cuantificaciones se realizaron a partir de al menos tres experimentos independientes para garantizar un análisis estadístico adecuado.

### 3.10 Mediciones de masa y ADN mitocondrial

De cada línea celular se obtuvo una fracción enriquecida en mitocondria a partir de dos placas de 100 mm al 90% de confluencia. Las células se lisaron con buffer MSH suplementado con un cóctel de inhibidores de fosfatasa y un cóctel de inhibidores de proteasas mencionados previamente. Se obtuvo una fracción mitocondrial como se describió previamente. Para medir la masa mitocondrial, 30  $\mu$ g de la fracción enriquecida en mitocondrias fueron incubados con MitoTracker™ Green FM (REF M7514, Invitrogen) por 30 minutos a 37 °C, y luego se midió la intensidad de fluorescencia utilizando el lector de placas Synergy HTX multi-mode reader, Biotek, utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 528 nm. Para la medición del ADN mitocondrial, 10  $\mu$ g de la fracción enriquecida en mitocondrias fueron incubados por 5 minutos a temperatura ambiente con PicoGreen (Nº catálogo: P11496, Thermo Scientific), y la fluorescencia (excitación 485 nm y emisión 528 nm) se midió en el lector de placas Synergy HTX multi-mode reader, Biotek.

### 3.11 Análisis cualitativo de mitocondrias mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

Las líneas celulares se prepararon según procedimientos estandarizados del centro de microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. Las células de las distintas líneas celulares fueron crecidas en placas de 60 mm hasta llegar a una confluencia del 80%. Luego fueron lavadas con PBS 1X y tratadas con 1 ml del fijador glutaraldehído 3% para luego ser centrifugadas a 600 x g por 10 min a 4 °C. Luego fueron fijadas con tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato durante 90 min a temperatura ambiente. A continuación, los cortes se trataron con acetato de uranilo acuoso al 1%, se deshidrataron en acetona y se incluyeron en resina Epon. Finalmente, las secciones ultrafinas se colocaron en rejillas de cobre para microscopía electrónica, se tiñeron con acetato de uranilo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Phillips Tecnai 12 (Philips Electron Optics, Holanda) a 80 kV. Todo esto fue realizado de acuerdo a los protocolos de la facility de la Unidad de Microscopía avanzada de la Universidad Católica de Chile.

### 3.12 Medición de consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió a partir de  $5 \times 10^5$  células contadas en una cámara de Neubauer. Las células fueron incubadas con los sustratos oxidativos piruvato 5 mM y malato 2.5 mM. Se utilizó un kit para medir consumo de oxígeno (Extracellular Oxygen Consumption Assay, ab197243, Abcam), el cual posee un compuesto fluorescente que al estar en contacto con el oxígeno apaga su señal. Finalmente, se añade una capa de aceite en la parte superior de la placa para limitar la difusión de oxígeno. Longitud de onda de excitación 280-360 nm y de emisión 630-680 nm.

### 3.13 Ensayo de *live cell imaging*

Células HeLa fueron crecidas en placas Mat Tek de *live cell imaging*. Al otro día, los vectores GFP-GOLPH3-WT y YFP-DRP1 fueron transfectados con Lipofectamina 2000 siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después de 16 horas, las células fueron incubadas con Mitotracker rojo lejano no sensible a potencial por 20 minutos a 37°C, y visualizadas en un microscopio confocal Leica TCS SP8. Se realizaron 103 videos con al menos 300 fotos cada uno tomadas cada 0.8 segundos. Los videos fueron deconvolucionados con el programa Huygens Essential y visualizados con ImageJ.

### 3.14 Análisis estadístico

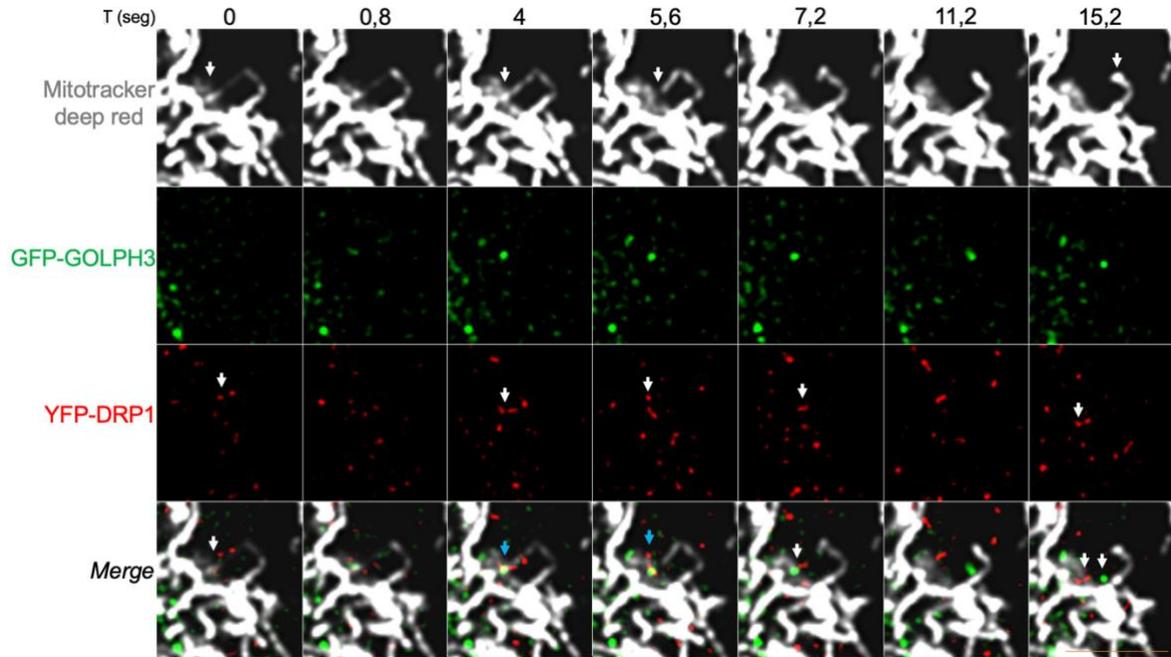
Todos los análisis de los datos fueron realizados en GraphPad Prisma 8, versión 8.2.1 (San Diego, CA, USA). Los resultados fueron representados en gráficos con la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). La significancia estadística de la comparación de datos fue realizada con T de Student, o con ANOVA de una o dos vías. Valores de  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*) fueron considerados estadísticamente significativos y se indican en cada figura.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 GOLPH3 y su posible participación en la fisión mitocondrial

Como Nakashima y sus colaboradores observaron que los niveles de GOLPH3 afectan la masa mitocondrial (Nakashima-Kamimura et al., 2005), nos preguntamos si GOLPH3 podría influenciar directamente la función de la mitocondria. Antecedentes de la literatura han evidenciado que vesículas provenientes del AG que contienen PI4P participan en los eventos de fisión mitocondrial (Nagashima et al., 2020). Como GOLPH3 es una proteína que se une a PI4P, decidimos estudiar si GOLPH3 también podría participar en estos eventos. Para esto, realizamos análisis de videomicroscopía de fluorescencia en células vivas. Sorprendentemente, células HeLa transfectadas con GFP-GOLPH3 y YFP-DRP1, utilizado este último para marcar sitios de fisión mitocondrial, mostraron estructuras vesiculares conteniendo GFP-GOLPH3 localizarse en sitios marcados previamente por YFP-DRP1 donde subsecuentemente observamos fisión mitocondrial (Figura 2). En el tiempo inicial de la videomicroscopía mostrada en la Figura 2 se observó la aparición de YFP-DRP1 en el sitio donde va a ocurrir el evento de fisión, pero no se observó la presencia de GFP-GOLPH3. Pasados 0,8 segundos se observó la presencia de una estructura vesicular conteniendo GFP-GOLPH3 en el sitio de fisión, colocalizando con YFP-DRP1, y posteriormente con las mitocondrias a los 4 segundos, antes de que ocurra la fisión. Ya a los 5,6 segundos ocurrió la fisión mitocondrial, aún estando localizado GFP-GOLPH3 y YFP-DRP1 en la zona de fisión. Finalmente, desde los 7,2 segundos en adelante, se observó la deslocalización de GFP-GOLPH3 y posteriormente de YFP-DRP1, cuando ya la mitocondria estaba fisionada. En 85 videos analizados se encontraron 184 eventos de fisión. De estos, en el 21% se observó a GFP-GOLPH3 presente en los sitios de fisión mitocondrial (38 eventos). Por lo tanto, estos resultados sugieren que GOLPH3 podría tener una función en alguna etapa de la fisión mitocondrial, después de la llegada de DRP1, como por ejemplo ayudando a generar la

constricción del túbulo, en conjunto con DRP1. Se requieren estudios adicionales para dilucidar su función.



**Figura 2. GFP-GOLPH3 se localiza en los sitios de fisión mitocondrial después de la llegada de YFP-DRP1.** Ensayo de video microscopía de fluorescencia en células HeLa vivas. Se observa con un aumento de 2X a partir de la imagen obtenida a distintos tiempos de células que expresan transientemente GFP-GOLPH3 y YFP-DRP1, y mitocondrias incubadas con Mitotracker *Deep red*. Flecha azul: evento de fisión; flecha blanca: seguimiento de GFP-GOLPH3 y de YFP-DRP1; flecha morada: colocalización de YFP-DRP1 con GFP-GOLPH3.

Como el resultado anterior sugiere que GOLPH3 podría estar involucrado en los eventos de fisión mitocondrial, nos preguntamos qué pasaría con la red y la función mitocondrial en una línea celular depletada de GOLPH3. Por lo tanto, el primer objetivo de esta tesis fue “Determinar el efecto de la ausencia de GOLPH3 sobre la morfología y función de las mitocondrias”. Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 *wild-type* (MDA-WT) y MDA-MB-231 depletadas de GOLPH3 (MDA-GOLPH3-KO) generadas previamente en el laboratorio por la metodología de edición genética utilizando el sistema CRISPR-Cas9 (Cavieres et al., manuscrito en preparación).

Antecedentes previos han evidenciado que el *knock-down* (KD) de GOLPH3 provoca una disminución en la masa mitocondrial de células HeLa (Nakashima-Kamimura et al., 2005). Los autores sugieren que GOLPH3 podría regular la masa mitocondrial a través de la regulación de cardiolipina, un lípido específico de la membrana interna mitocondrial. En específico, se observó que el silenciamiento de GOLPH3 conduce a una disminución de los niveles de cardiolipina, correlacionándose con una reducción de la masa mitocondrial (Nakashima-Kamimura et al., 2005). Considerando que estos estudios se realizaron con una línea celular *knock-down* (KD) para GOLPH3, se desconoce si el *knock-out* (KO) de GOLPH3 podría tener un efecto en las mitocondrias. Por ello, en esta tesis se inició el estudio analizando las diferencias que pudieran existir en las mitocondrias de la línea MDA-WT comparándolas con la línea MDA-GOLPH3-KO.

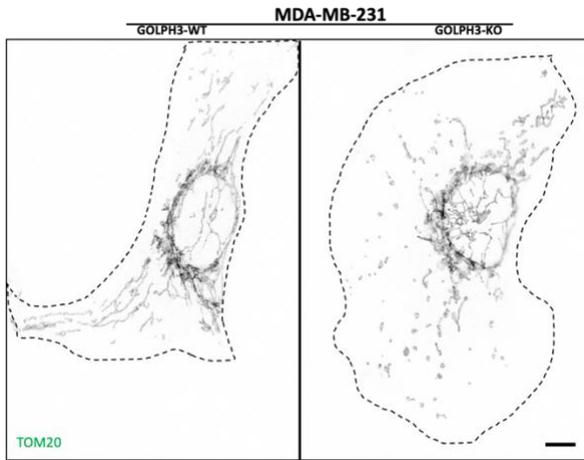
#### 4.2 La depleción de GOLPH3 en células MDA-MB-231 promueve la fragmentación de la red mitocondrial sin cambios proteicos asociados a fisión y fusión.

Como GOLPH3 podría tener una función en la fisión mitocondrial, se estudió si un cambio en sus niveles de expresión podría alterar la red mitocondrial. Para evaluar esta posibilidad, se utilizó la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 depletada de GOLPH3 (MDA-GOLPH3-KO). Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo contra TOM20, una proteína de la membrana externa mitocondrial (Yamano et al., 2008). En las células MDA-WT observamos un patrón de red mitocondrial tubular interconectado (Figura 3A), mientras que en las células MDA-GOLPH3-KO observamos una red mitocondrial más fragmentada y menos interconectada (Figura 3A). Se cuantificó la fragmentación mitocondrial con el plugin 3D counter del programa ImageJ, el cual cuenta el número de objetos y el volumen de cada uno (Figura 3B). Se tomó como criterio de fragmentación aquellas mitocondrias en las que su volumen disminuye, perdiendo la interconexión, generando un aumento en el número de mitocondrias (Parra et al., 2008). Se comparó el volumen (Figura 3C) y el número de mitocondrias (Figura 3D) entre las células MDA-WT y MDA-GOLPH3-KO. Se observó que las mitocondrias de las células MDA-GOLPH3-KO tienen un 60% de disminución del volumen comparado con las mitocondrias de las células MDA-WT. Además, se observó que las células depletadas de GOLPH3 poseen un aumento del 40% del número promedio de mitocondrias por célula comparado con las células MDA-WT. Considerando que las células depletadas de GOLPH3 presentaron un mayor número de mitocondrias con un menor volumen, se sugiere que las mitocondrias de estas células podrían estar más fragmentadas.

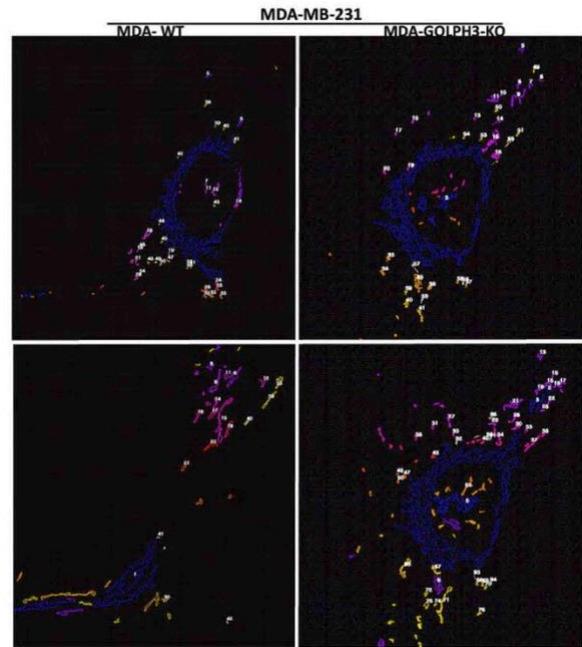
Un aumento en la fragmentación mitocondrial podría deberse a un desbalance en los procesos de fisión y fusión, principalmente por una disminución en la tasa de fusión mitocondrial (Twig & Shirihai, 2011). Considerando que en las células MDA-GOLPH3-KO se observan mitocondrias más fragmentadas, se evaluó

si la ausencia de GOLPH3 podría afectar los niveles de proteínas asociadas a fusión y fisión mitocondrial. Mediante ensayos de western blot no se observaron cambios significativos en los niveles de MFN1, MFN2 y OPA1 (Figura 3E y F), todas proteínas de la maquinaria de fusión mitocondrial. Tampoco se observaron cambios en los niveles de DRP1 total y DRP1 fosforilado en la serina 616, la cual permite la traslocación de DRP1 desde el citosol hacia la membrana externa mitocondrial, promoviendo la fisión mitocondrial (Kashatus et al., 2015) (Figura 3G y H). Sin embargo, que no existan cambios en los niveles de DRP1 no necesariamente implica que no haya cambios en la fisión mitocondrial, ya que otros estudios han evidenciado fisión mitocondrial sin aumento en sus niveles o su estado de fosforilación (Nagashima et al., 2020). Cabe descartar que la función de DRP1 puede ser modulada por otros tipos de modificaciones post traduccionales, como la S-nitrosilación, ubiquitilación y sumoilación (Kar et al., 2017), e incluso, se ha observado fisión mitocondrial independiente de esta proteína (Che et al., 2015). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que GOLPH3 podría participar en la regulación de la red mitocondrial, posiblemente durante los eventos de fisión mitocondrial, por medio de un mecanismo que no afecta los niveles de las proteínas DRP1, MFN1, MFN2 y OPA1.

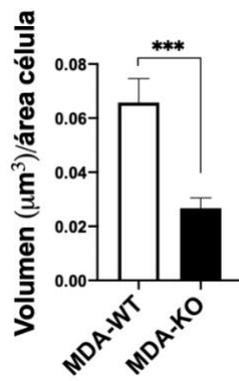
A



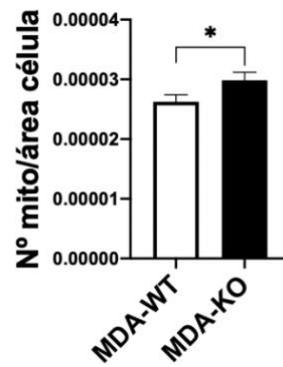
B



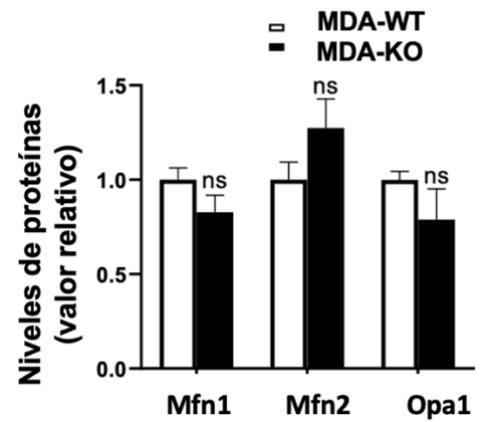
C



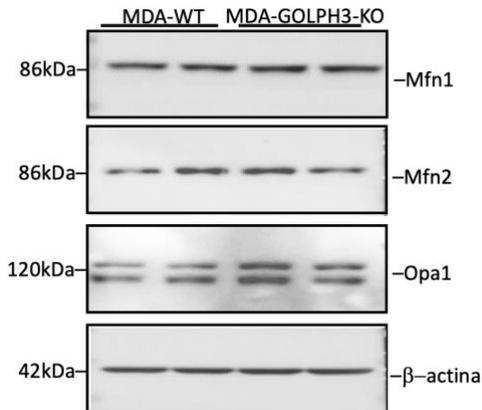
D



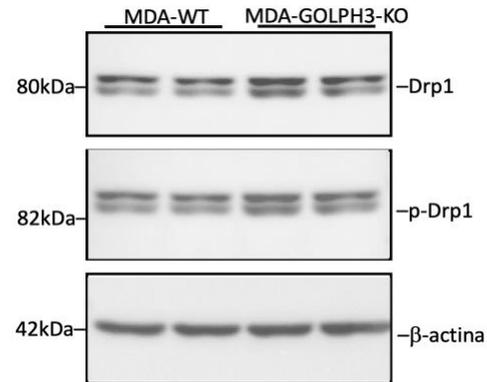
E



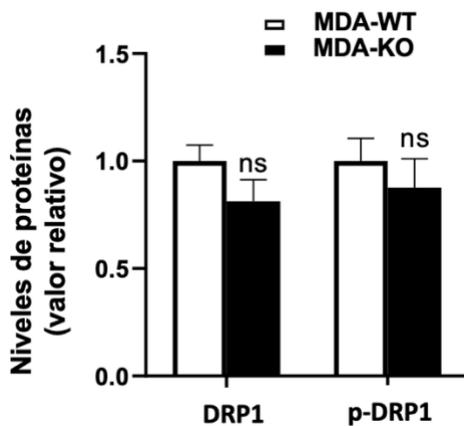
F



G



H



**Figura 3. Células depletadas de GOLPH3 tienen una red mitocondrial con menor volumen y mayor número de mitocondrias, pero sin cambios en los niveles de proteínas de fisión y fusión mitocondrial.** (A) Ensayo de inmunofluorescencia indirecta realizado en células MDA-WT y MDA-GOLPH3-KO ocupando como marcador mitocondrial a TOM20. Las imágenes fueron tomadas en z-stack, en donde se cuantificó con el plugin 3D counter con el programa ImajeJ (B). (C) Cuantificación del volumen mitocondrial, (D) del número de mitocondrias con el plugin 3D counter de ImageJ. Se realizaron 3 ensayos independientes en cada condición. Para cada línea se extrajeron proteínas totales, en donde se realizó posteriormente un ensayo de western blot. En (E y F) se muestran proteínas relacionadas con la fusión mitocondrial y en (G y H), proteínas relacionadas con la fisión mitocondrial. Se realizaron 3 ensayos independientes en cada condición.

#### 4.3 La ausencia de GOLPH3 en células MDA-MB-231 reduce la función bioenergética mitocondrial con un aumento de especies reactivas de oxígeno.

Se ha evidenciado que cambios en la masa mitocondrial podrían cambiar la función bioenergética mitocondrial. Por ejemplo, se ha observado que un aumento en la masa mitocondrial aumenta significativamente la función bioenergética, aumentando la producción de ATP (Jeong et al., 2014). También se ha observado que en condiciones fisiológicas, tanto la distribución de las mitocondrias a lo largo de la célula, como los eventos de fisión y fusión mitocondrial están relacionadas con su actividad metabólica (Jhun et al., 2018). Como en las células MDA-GOLPH3-KO se observaron mitocondrias más fragmentadas comparadas con las MDA-WT, nos preguntamos si este cambio en la red mitocondrial podría disminuir la función bioenergética. Para evaluar esto, primero se midió el potencial de membrana mitocondrial realizando un ensayo en placa, incubando las células con MitoTracker™ Red CMXRos, que es una versión reducida del Mitotracker. Este reactivo no es fluorescente, pero fluoresce cuando es oxidado, lo que ocurre cuando la mitocondria está funcional (Kholmukhamedov et al., 2013). En las células MDA-GOLPH3-KO se observó una menor fluorescencia comparado con la línea MDA-WT (Figura 4A). Esta disminución en la fluorescencia indica que la ausencia de GOLPH3 generó una disminución del potencial de membrana mitocondrial que fue corroborado además con la sonda tetrametilrodamina éster etílico (TMRE), que es ampliamente usada para medir potencial de membrana mitocondrial (4B) (Crowley et al., 2016).

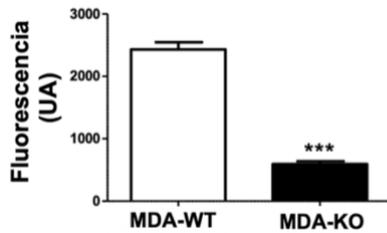
Como el potencial de membrana mitocondrial generado por las bombas de protones es un componente esencial en el proceso de generación de energía por la fosforilación oxidativa (Zorova et al., 2018), se analizó si la disminución del potencial de membrana mitocondrial causada por la depleción de GOLPH3 generaba una reducción en el contenido de ATP. Se midió el contenido de ATP en un lisado celular total. Se realizó un ensayo luminiscente utilizando la enzima luciferasa y luciferina

como sustrato. Se observó una disminución significativa en los niveles de ATP en las células MDA-GOLPH3-KO de un 26% ( $74,0 \pm 29,5\%$ ), comparado con las células MDA-WT ( $100,0 \pm 37,3\%$ ) (Figura 4C). Esta observación sugiere que la ausencia de GOLPH3 podría causar una disminución en la generación de ATP mitocondrial, pero considerando que el ATP no solo se produce en las mitocondrias, la reducción en los niveles de ATP observada en las células MDA-GOLPH3-KO también podría ser consecuencia de una disminución en la glicólisis (Mookerjee et al., 2017). Para investigar si la disminución en los niveles de ATP era al menos en parte dependiente de la función mitocondrial, se analizaron los niveles de ATP producidos a partir de una fracción enriquecida en mitocondrias, suplementada con los sustratos oxidativos malato y piruvato utilizados en ensayos de respiración mitocondrial (Maruyama et al., 2013). El piruvato es descarboxilado en la matriz mitocondrial produciendo acetil coenzima A, que es un sustrato del ciclo de Krebs, produciendo NADH y FADH<sub>2</sub>. En el caso del malato, este es re-oxidado por la malato deshidrogenasa en la matriz mitocondrial produciendo NADH. NADH y FADH<sub>2</sub> son utilizados por la mitocondria para la producción de ATP en la fosforilación oxidativa (Martínez-Reyes & Chandel, 2020). Se observó que la fracción enriquecida de mitocondrias obtenidas de células MDA-GOLPH3-KO presentan una disminución significativa en la producción de ATP ( $73,6 \pm 12,4\%$ ), comparado con las MDA-WT ( $100 \pm 12,5\%$ ) (Figura 4D), sugiriendo que la reducción de ATP observada en los extractos totales de las células MDA-GOLPH3-KO pudiera ser en parte consecuencia de la disfunción mitocondrial.

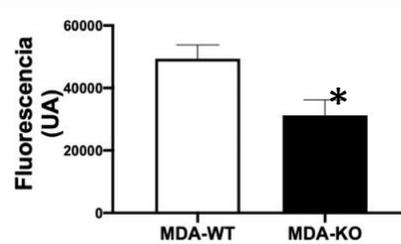
Un mal funcionamiento de la cadena transportadora de electrones evidenciado por una disminución en el contenido y producción de ATP podría estar acompañado de un incremento en los niveles de ROS (Murphy, 2009). Por esto, se analizó el contenido de ROS en células MDA-WT y MDA-GOLPH3-KO. Se utilizó 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (CM-H2DCFDA), un reactivo que difunde pasivamente dentro de la célula siendo retenido por la acción de esterasas intracelulares (Karlsson et al., 2010). En condiciones basales el reactivo no es fluorescente. Sin embargo, cuando hay generación de ROS dentro de la célula puede ser oxidado rápidamente emitiendo fluorescencia y puede ser cuantificado

por fluorimetría. El análisis de fluorimetría mostró un aumento significativo de ROS en las células MDA-GOLPH3-KO de un 60,5% ( $160,5 \pm 20,9\%$ ), comparado con células MDA-WT ( $100\% \pm 38,8\%$ ) (Figura 4E), sugiriendo que la ausencia de GOLPH3 genera un desbalance oxidativo que lleva a elevados niveles de ROS, posiblemente por un incremento en la producción de especies oxidantes en la mitocondria o por una disminución de las defensas antioxidantes. En conjunto, estos resultados permiten concluir que la fragmentación mitocondrial observada por la depleción de GOLPH3 se acompaña de mitocondrias disfuncionales debido en parte a un mal funcionamiento de la cadena transportadora de electrones.

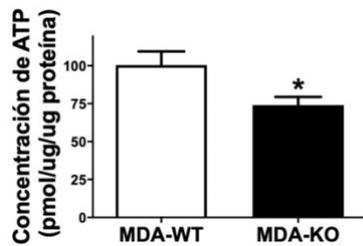
A  $\Delta\Psi_m$  MitoTracker™ Red CMXRos



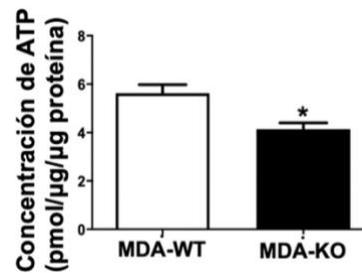
B  $\Delta\Psi_m$  TMRE



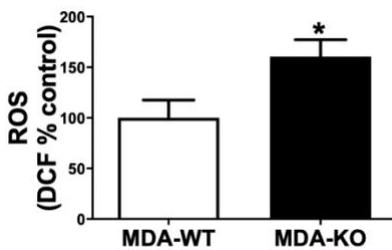
C Contenido de ATP



D Producción de ATP



E Contenido de ROS



**Figura 4. Las células MDA-GOLPH3-KO presentan una disminución en la función bioenergética mitocondrial con un aumento de ROS.** Para medir la función bioenergética mitocondrial en células MDA-WT y MDA-GOLPH3-KO, se midió en (A) el potencial de membrana mitocondrial mediante un ensayo en placa de fluorescencia con Mitotracker red™ Red CMXRos (n=3), (B) el contenido de ATP a partir de un extracto de proteínas totales mediante un ensayo de luminiscencia (n=15), en (C) la producción de ATP mediante un fraccionamiento enriquecido de mitocondrias incubado con sustratos oxidativos (n=5) y (D) la medición de ROS a partir de un lisado total (n=4).

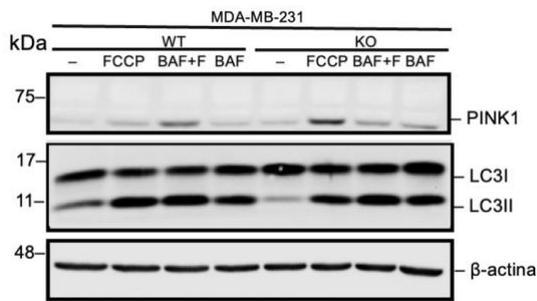
Así, la disminución en la producción de ATP, en conjunto con la disminución del potencial de membrana mitocondrial, podría sugerir la activación de mecanismos para eliminar estas mitocondrias dañadas, como la mitofagia.

#### 4.4 Células MDA-MB-231 depletadas de GOLPH3 presentan un aumento en los niveles de PINK1.

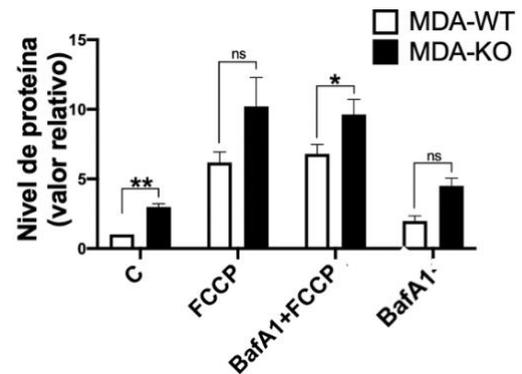
Se ha descrito que una disminución en el potencial de membrana mitocondrial podría relacionarse con un incremento en la degradación autofágica (Ren et al., 2021). En base a esto, se analizó si existía un aumento de los niveles de quinasa 1 inducida por PTEN (PINK1) en células MDA-GOLPH3-KO, comparadas con las MDA-WT. En condiciones basales cuando la mitofagia no está activa, PINK1 se degrada por el proteasoma. De lo contrario, cuando la mitofagia está activa, PINK1 no se degrada, queda localizada en la membrana externa mitocondrial y fosforila a Parkina, una E3 ubiquitina ligasa. Parkina ubiquitina proteínas de la membrana externa mitocondrial que serán reconocidas por p62, un receptor de autofagia, provocando la degradación mitocondrial en el lisosoma (Jin & Youle, 2012). Se observó un aumento significativo de los niveles de PINK1 en las células MDA-GOLPH3-KO, comparadas con las células MDA-WT (Figura 5A y B). Se utilizó FCCP como control positivo, ya que se ha observado en distintas líneas celulares que este compuesto induce selectivamente mitofagia (Ashrafi & Schwarz, 2013; Vives-Bauza et al., 2010). Se observó que las células MDA-GOLPH3-KO tratadas con FCCP, aumentaban aún más sus niveles de PINK1 comparadas con las células MDA-WT (Figura 5A y B). Además, al tratarlas con bafilomicina A1 para inhibir el flujo autofágico (Mauvezin, et al. 2015), PINK1 tuvo una tendencia a aumentar en las células depletadas de GOLPH3, sin ser significativo; pero cuando fueron tratadas con bafilomicina más FCCP, las células MDA-GOLPH3-KO, mostraron un aumento significativo de PINK1 comparado con las células MDA-WT. Estos resultados se correlacionan con la acumulación de LC3II cuando las células fueron tratadas con bafilomicina A1 (Figura 5C). Por lo tanto, estos resultados muestran un aumento en

los niveles basales de PINK1 en las células MDA-GOLPH3-KO comparadas con las células MDA-WT, lo que sugiere una posible activación de la mitofagia. Sin embargo, faltan más estudios para demostrar que está activa la mitofagia y más aún el flujo mitogáxico. Al respecto, se ha sugerido que la activación de la mitofagia podría activar otros mecanismos compensatorios, como la biogénesis mitocondrial.

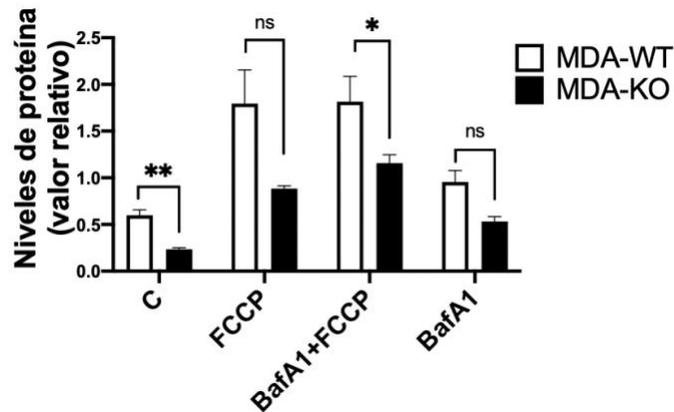
A



B



C



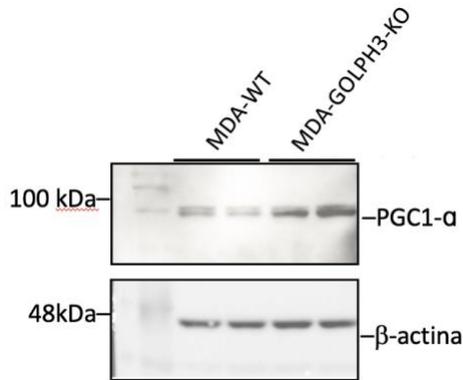
**Figura 5. Células MDA-GOLPH3-KO presentan un cambio significativo en los niveles de PINK1, comparadas con las MDA-WT.** Para inhibir el flujo autofágico, las células MDA-WT y MDA-GOLPH3-KO fueron tratadas con bafilomicina A1 (el cual es un inhibidor de la ATPasa vacuolar del lisosoma) por 3 horas y con FCCP 10  $\mu$ M (para inducir mitofagia) por 4 horas de manera simultánea. Luego, se extrajeron proteínas totales para posteriormente realizar un ensayo de western blot. En (A y B) se observan los niveles de PINK1, proteína clave en la mitofagia, con los distintos tratamientos realizados y en (C) la tasa de LC3I/LC3II. La lipidación de LC3I a LC3II se utilizar como marcador de autofagosomas. Se realizaron 3 experimentos independientes. La cuantificación densitométrica de las bandas fue realizada con el programa ImageJ.

#### 4.5 Células MDA-MB-231 delecionadas de GOLPH3 presentan un aumento de los niveles de PGC1- $\alpha$ sin cambios en la masa mitocondrial.

Se ha descrito que una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y una activación de la mitofagia podría acompañarse de un aumento en la biogénesis mitocondrial como mecanismo compensatorio (Ren et al., 2021). Por esta razón, se estudió si la ausencia de GOLPH3 pudiese tener un impacto sobre el coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1- $\alpha$ ). PGC1- $\alpha$  es un coactivador transcripcional considerado el regulador maestro de la biogénesis mitocondrial (Frey Halling & Pilegaard, 2020). Para ello, se analizaron por western blot (WB) los niveles de la proteína PGC1- $\alpha$ . Los análisis por WB mostraron un incremento significativo en los niveles de PGC1- $\alpha$  en las células MDA-GOLPH3-KO del 85% (185,0%  $\pm$  23,1%), respecto a las células MDA-WT (100,0%  $\pm$  33,7%) (Figura 6A y B). Se ha sugerido que un aumento en los niveles de PGC1- $\alpha$  se correlacionan con un incremento en su función como coactivador transcripcional de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial (Ren et al., 2021). Por ello, se analizó si existía un aumento en la masa mitocondrial y en el contenido de ADN mitocondrial en las células MDA-GOLPH3-KO. La masa mitocondrial se analizó incubando una fracción enriquecida de mitocondrias con la sonda MitoTracker™ Green FM por 30 minutos y midiendo la fluorescencia en un lector de placas Synergy HTX multi-mode reader, Biotek. No se observaron cambios significativos en la masa mitocondrial en las células MDA-GOLPH3-KO, comparada con las células MDA-WT (Figura 6C). Para medir el contenido de ADN mitocondrial, se utilizó el marcador fluorescente PicoGreen, el cual posee una carga positiva que interactúa electrostáticamente con el grupo fosfato del ADN. A partir de un fraccionamiento enriquecido de mitocondrias, estas fueron incubadas con PicoGreen y finalmente la fluorescencia fue medida en un lector de placas Synergy HTX multi-mode reader, Biotek. No se observaron diferencias significativas en el contenido de ADN mitocondrial entre las células MDA-GOLPH3-KO y las células MDA-WT (Figura 6D). Por lo tanto, se puede concluir que el aumento de los niveles proteicos de PGC1- $\alpha$  aparentemente no está relacionado con un aumento de la

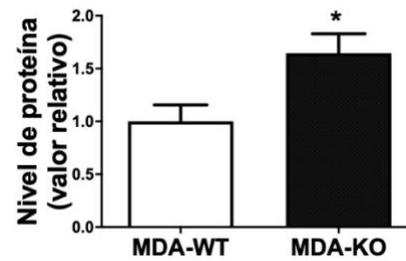
masa mitocondrial. Como PGC1- $\alpha$  también estimula la transcripción génica asociada a la respuesta antioxidante (Aquilano et al., 2013), el aumento de sus niveles podría estar relacionado con esta función, ya que comparadas con las células MDA-WT las células MDA-GOLPH3-KO poseen un aumento de ROS.

A

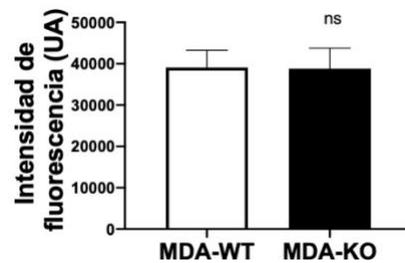


B

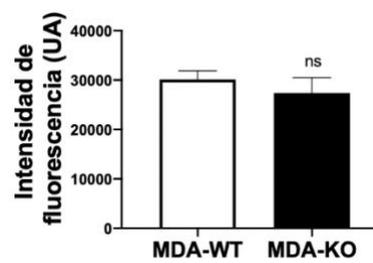
Niveles de PGC1-α



C Medición de ADN mitocondrial



D Medición de masa mitocondrial



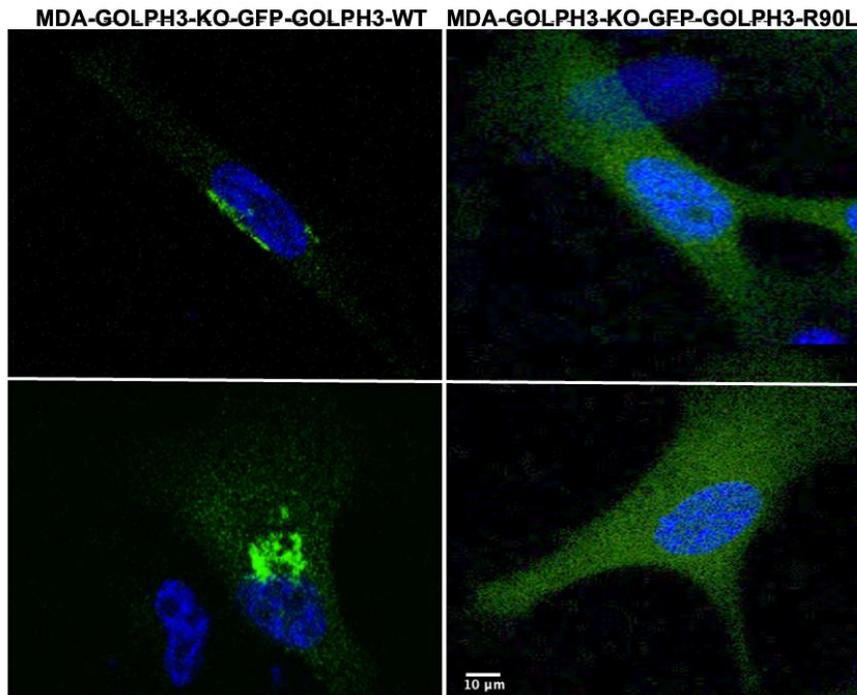
**Figura 6. Células MDA-GOLPH3-KO presentan un aumento en los niveles de PGC1-α, sin cambios en la masa ni en la cantidad de ADN mitocondrial.** Se analizaron los niveles proteicos de PGC1-α mediante western blot (A), en donde se observa un aumento significativo de los niveles de esta proteína en las células MDA-GOLPH3-KO comparadas con las células MDA-WT (B). Para medir la masa y el ADN mitocondrial, se realizó un fraccionamiento enriquecido de mitocondrias en células MDA-WT y MDA-GOLPH3-KO, y esta fracción fue incubada en (C) con la sonda PicoGreen para marcar ADN y en (D) con la sonda Mitotracker green para marcar mitocondrias. La fluorescencia fue medida en un lector de placas. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes.

Como resumen de este objetivo, se sugiere que GOLPH3 podría tener una participación directa en los eventos de fisión, evidenciado por la llegada de este hacia los sitios de fisión y colocalizando con Drp1. Cabe destacar que no en todos los eventos observados se observa a GOLPH3, por lo que se sugiere que otras proteínas, a parte de GOLPH3 podrían estar ejerciendo similares funciones. Además, la ausencia de GOLPH3 genera cambios en las mitocondrias, observándose en células MDA-GOLPH3-KO mitocondrias con una disminución en la función bioenergética mitocondrial, indicada por una disminución en el contenido y producción de ATP, y con un aumento en los niveles de ROS. Además, la red mitocondrial se encuentra más fragmentada. Al estar las mitocondrias disfuncionales pudiesen estar siendo degradadas mediante mitofagia, ya que se observó un aumento de los niveles de PINK1 y un aumento en los niveles de PGC1- $\alpha$ , posiblemente como un mecanismo de compensación, que aparentemente no está relacionada con la biogénesis mitocondrial.

Como GOLPH3 se encuentra localizado tanto en el AG, como en el citosol, el siguiente paso en este trabajo de tesis fue evaluar si la pérdida de localización en el AG, es decir, si GOLPH3 en el citosol podría genera el mismo fenotipo observado al depletar completamente a la célula de GOLPH3.

#### 4.6 GOLPH3 localizado en el citosol genera una red mitocondrial interconectada con una distribución hacia la zona perinuclear.

Con respecto al segundo objetivo, “Determinar la contribución del pool citosólico de GOLPH3 en la morfología y función de las mitocondrias”. Como GOLPH3 es una proteína que cicla entre el AG y el citosol (Snyder et al., 2006; Tenorio et al., 2016), se evaluó si solo el pool citosólico pudiese recapitular el fenotipo observado en las células MDA-GOLPH3-KO. Para localizar a GOLPH3 en el citosol, se utilizó una versión de GOLPH3 fusionada a la proteína GFP con la sustitución R90L. Esta sustitución afecta la interacción de GOLPH3 con el AG al impedir su unión con PI4P, fosfolípido enriquecido en el AG, localizándose GOLPH3 en células HeLa exclusivamente en el citosol (Dippold et al., 2009; Wood et al., 2009). En base a esto, se transfectaron transientemente células MDA-GOLPH3-KO con la mutante GOLPH3-R90L fusionada a la proteína GFP (GFP-GOLPH3-R90L), comparándola con la expresión de la versión GOLPH3-WT (GFP-GOLPH3-WT). Mediante microscopía confocal se analizó la localización de ambas versiones confirmando que GFP-GOLPH3-R90L presenta una marca citosólica, comparado con la versión GFP-GOLPH3-WT que presenta una distribución enriquecida en la zona perinuclear, característica del AG (Dippold et al., 2009; Wood et al., 2009) (Figura 7).

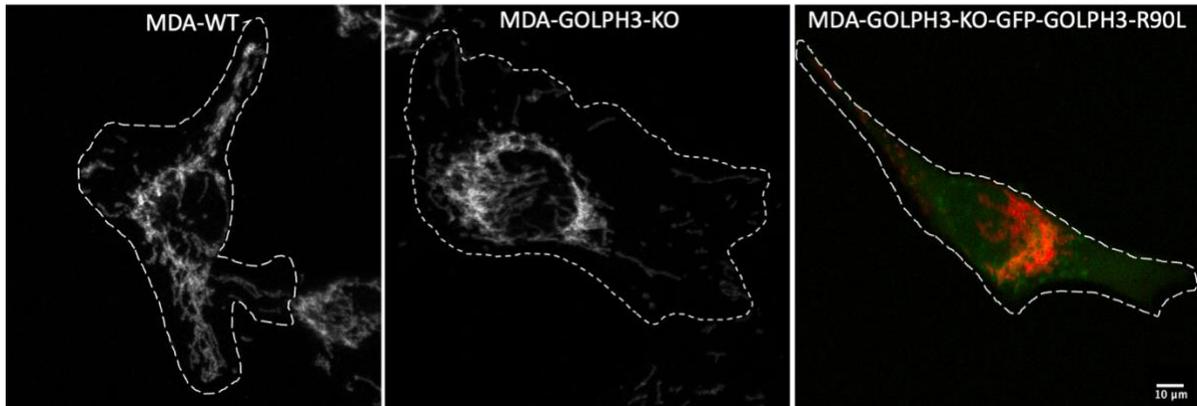


**Figura 7. La variante GFP-GOLPH3-R90L muestra un patrón de localización citosólico, comparado con GFP-GOLPH3-WT, que se observa un patrón perinuclear consistente con AG.** Células MDA-GOLPH3-KO fueron previamente transfectadas con el vector GFP-GOLPH3-WT o GFP-GOLPH3-R90L, incubadas con DAPI para marcar el núcleo y fijadas por 1 hora con paraformaldehído al 4%. Posteriormente fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Se observó una localización distinta en cada una de las variantes.

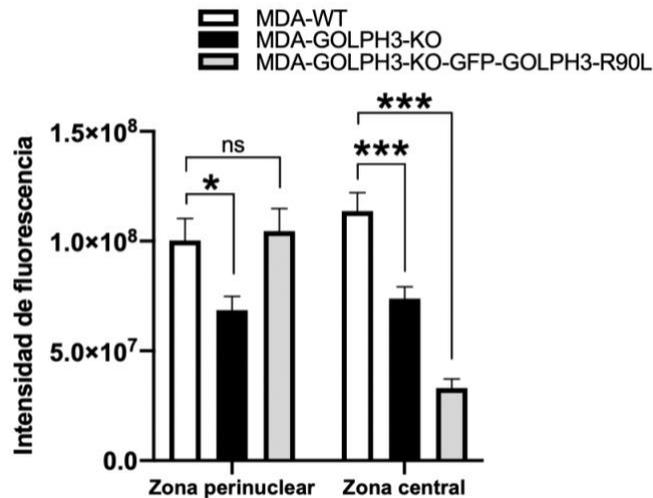
Con la validación de estas herramientas, GFP-GOLPH3-WT y GFP-GOLPH3-R90L, se procedió a estudiar el efecto de su expresión en la morfología y función mitocondrial. Se observó que el rescate con GFP-GOLPH3-R90L en células MDA-GOLPH3-KO generó un fenotipo mitocondrial distinto al observado en las células MDA-WT y MDA-GOLPH3-KO, caracterizado por la distribución de las mitocondrias mayormente hacia una zona perinuclear (Figura 8A y B).

Se cuantificó la zona perinuclear y central de al menos 40 células mediante el programa ImageJ. Para esto, se hicieron distintos círculos que comenzaron desde el núcleo, la zona perinuclear y finalmente la zona periférica. Se analizó la intensidad de fluorescencia de cada círculo por separado (es decir, de la zona nuclear, perinuclear y periférica). Como se observa en la Figura 8B, las mitocondrias en las células MDA-GOLPH3-KO rescatadas con GFP-GOLPH3-R90L presentaron una distribución mayor en la zona perinuclear que en la zona central, a diferencia de las MDA-WT y las MDA-GOLPH3-KO que presentan una distribución tanto perinuclear como central. Por lo tanto, el rescate con la variante GFP-GOLPH3-R90L, sugiere una pérdida de función de GOLPH3 al no estar localizado en el AG, o una ganancia de función de GOLPH3 localizado en el citosol.

A



B

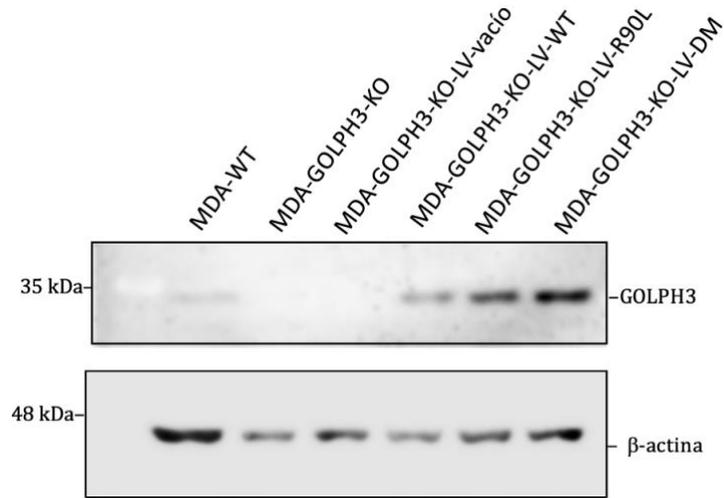


**Figura 8. Células MDA-GOLPH3-KO rescatadas con GFP-GOLPH3-R90L presentan mitocondrias con una localización perinuclear.** (A) Para observar la localización mitocondrial, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta contra TOM20 en las células MDA-WT, MDA-GOLPH3-KO y MDA-GOLPH3-KO transfectadas con la versión GFP-GOLPH3-R90L (MDA-GOLPH3-KO-R90L). En MDA-WT y MDA-GOLPH3-KO se observa a TOM20 en gris. En MDA-GOLPH3-KO rescatadas con GFP-GOLPH3-R90L, verde GFP-GOLPH3 y rojo TOM20. (B) Se cuantificó la distribución de las mitocondrias dentro de la célula, separándolas en perinuclear y central. Estas cuantificaciones fueron realizadas con el programa ImageJ. Se realizaron 3 experimentos independientes.

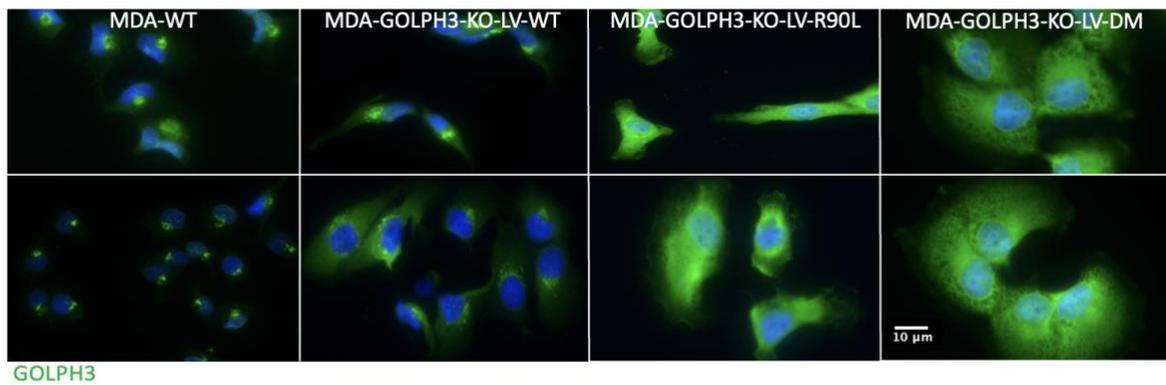
Estos resultados fueron validados utilizando herramientas alternativas de estudio. Primero, considerando que los experimentos previos fueron obtenidos con una versión de GOLPH3 fusionada al tag GFP, el cual podría ejercer un efecto artefactual sobre esta proteína, se utilizó expresión exógena de GOLPH3 sin fusión de algún tag. Para ello, se realizó el subclonamiento de GOLPH3 en un vector lentiviral que confiere resistencia a puromicina (pLVX-puro). Con este vector, se generaron dos versiones mutantes de GOLPH3, la versión GOLPH3-R90L antes descrita y la versión GOLPH3-R171A/R174L, una mutante previamente caracterizada que también pierde interacción con PI4P y el AG, localizándose en el citosol (Dippold et al., 2009). La racional de introducir esta segunda mutante fue para entregar evidencia adicional del efecto que puede producir la pérdida de localización de GOLPH3 en el AG.

Utilizando las células MDA-GOLPH3-KO como línea celular parental, se generaron líneas celulares para rescatar la expresión de GOLPH3, tanto con su versión WT como con las mutantes R90L y R171A/R174L, utilizando los respectivos vectores lentivirales. Estas líneas celulares se denominaron MDA-GOLPH3-KO-LV-WT, MDA-GOLPH3-KO-LV-R90L y MDA-GOLPH3-KO-LV-GOLPH3-R171A/R174L. Como control negativo de la transducción lentiviral, también se generó una línea celular utilizando el vector lentiviral vacío, la que se denominó MDA-GOLPH3-KO-LV-vacío. Se determinó el nivel de proteína de las variantes de GOLPH3 en las líneas celulares generadas mediante western blot. Se corroboró el rescate de la expresión de GOLPH3 en todas las líneas generadas (Figura 9A). Sin embargo, se observaron distintos niveles de proteína entre las distintas versiones de GOLPH3 (Figura 9A). Luego se determinó la localización de GOLPH3 por inmunofluorescencia indirecta. De acuerdo a lo esperado, en la línea MDA-GOLPH3-KO-LV-WT se observó una localización perinuclear de GOLPH3 característica del AG, localización no observada con las mutantes GOLPH3-R90L y GOLPH3-R171A/174L (Figura 9B).

A



B



**Figura 9. Rescate con las distintas versiones de GOLPH3 sobre la línea MDA-GOLPH3-KO.**(A) Se realizó un ensayo de western blot para analizar los distintos niveles de proteínas del rescate de GOLPH3 sobre la línea MDA-GOLPH3-KO. \*DM: R171A/R174L. (B) Para observar la localización de GOLPH3, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta contra GOLPH3 en las distintas líneas celulares, tanto las MDA-WT como las rescatadas con las distintas versiones de GOLPH3.

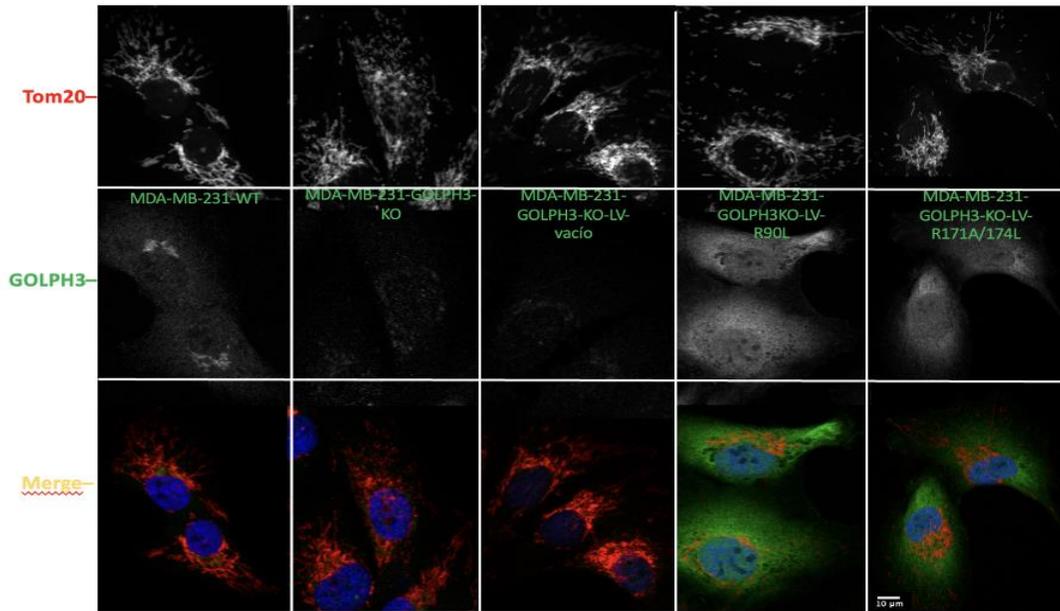
#### 4.7 La expresión de mutantes de GOLPH3 que no se localizan en el AG cambia la red y la ultraestructura mitocondrial.

Se exploró la red mitocondrial por microscopía de fluorescencia realizando una inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo contra la proteína TOM20 de la membrana externa de la mitocondria, de manera similar a lo que se realizó previamente en el contexto de la expresión de versiones de GOLPH3 fusionadas a GFP. Similar a lo descrito más arriba, se observó que el rescate con GOLPH3-R90L o con GOLPH3-R171A/R174L genera una localización mitocondrial perinuclear similar al antes mencionado (Figura 10A). Por lo tanto, se puede concluir que GOLPH3 en el citosol, por pérdida de su asociación al AG, genera cambios en la localización mitocondrial, generando una localización más perinuclear.

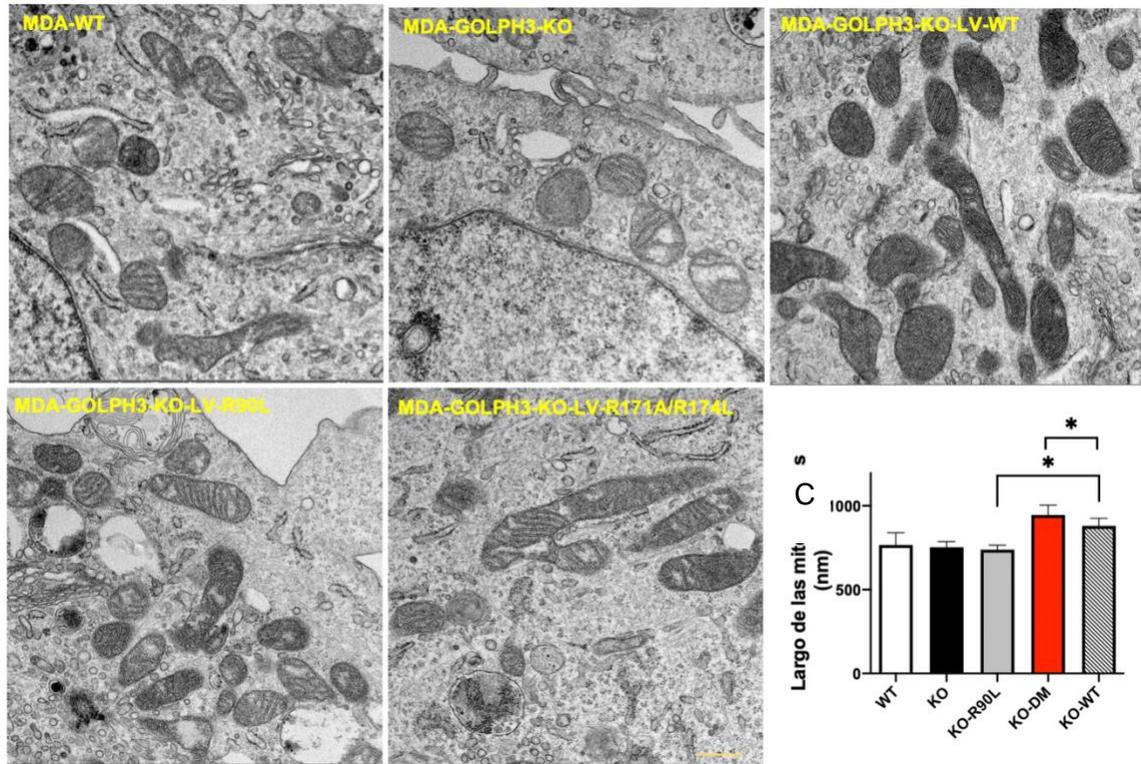
Luego, se analizó si la depleción de GOLPH3 y el rescate con las distintas versiones generan cambios en la ultraestructura mitocondrial. Las mitocondrias de las distintas líneas celulares fueron observadas mediante microscopía electrónica de transmisión. En un análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas observó que las células MDA-GOLPH3-KO poseen un largo similar, comparadas con las MDA-WT (Figura 9, B y C). Con respecto a las células MDA-GOLPH3-KO rescatadas con la versión GOLPH3-WT, se observó una tendencia al aumento del largo de las mitocondrias (Figura 10, B y C). En general, el análisis cuantitativo sugirió que el rescate con las distintas versiones de GOLPH3 sobre las células MDA-GOLPH3-KO restablece el largo de las mitocondrias en las células MDA-GOLPH3-KO-LV-R90L, pero no en las células MDA-GOLPH3-KO-LV-R171A/R174L, observándose mitocondrias mucho más alargadas comparadas con las células MDA-GOLPH3-KO-LV-WT.

En conclusión, existen diferencias en la morfología de las mitocondrias entre las células MDA-GOLPH3-KO y aquellas que fueron rescatadas con las distintas versiones de GOLPH3. Además, se observaron diferencias al comparar las mitocondrias de las células rescatadas con las versiones citosólicas de GOLPH3 R90L y R171A/R174L con la rescatada LV-GOLPH3-WT, observándose mitocondrias más lasgas en las rescatadas con la LV-R171A/R174L comparada con la rescatada LV-GOLPH3-WT.

A



B



**Figura 10. Células MDA-GOLPH3-KO rescatadas con las distintas variantes de GOLPH3 presentan un cambio en la distribución y largo de las mitocondrias.**

(A) Ensayo de inmunofluorescencia indirecta contra TOM20 y GOLPH3 en células MDA-WT, MDA-GOLPH3-KO y MDA-GOLPH3-KO transducidas con GOLPH3-WT o con las distintas versiones citosólicas de GOLPH3 (R90L o R171A/R174L). (B) Se tomaron imágenes de mitocondrias de al menos 5 células de cada línea celular indicada mediante microscopía electrónica de transmisión. Magnitud 13500 x. Las puntas de flecha rojas en las micrografías de las células MDA-GOLPH3-KO-LV-R90L indican mitocondrias más alargadas, y las puntas de flecha verdes en las micrografías de las células MDA-GOLPH3-KO-LV-R171A/R174L indican la posible formación de cuellos de botella. (C) Cuantificación del largo de las mitocondrias.

#### 4.8 Células MDA-MB-231 depletadas de GOLPH3 y rescatadas con las distintas versiones de GOLPH3 muestran diferentes cambios en la función bioenergética de las mitocondrias.

Diversos estudios muestran que existe una relación entre la función mitocondrial y la integridad estructural de las membranas mitocondriales, ya que, por ejemplo, la membrana interna mitocondrial representa el principal sitio de generación de ATP, conteniendo un alto porcentaje de proteínas que están involucradas en la fosforilación oxidativa (Formosa & Ryan, 2018). En base a esto, se realizó un análisis cuantitativo de la integridad de las membranas externas mitocondriales a partir de las mismas imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión indicadas más arriba. El análisis mostró que la mayor parte de las mitocondrias de las células MDA-WT posee crestas mitocondriales normales, consistente con una integridad normal de las membranas (Figura 11, A y B). Por el contrario, en la mayor parte de las mitocondrias de las células MDA-GOLPH3-KO se observa una tendencia a una pérdida de la integridad de la membrana externa mitocondrial (Figura 11A, flechas naranjas, y Figura 10B). Sorprendentemente, en comparación a las células MDA-WT y MDA-GOLPH3-KO, las células rescatadas con GOLPH3-WT muestran un aumento de la electrodensidad de las mitocondrias y de la integridad de las membranas (Figura 11, A y C) . En contraste, en las células rescatadas con GOLPH3-R90L o con GOLPH3-R171A/R174L se observaron mitocondrias menos electrodensas que las rescatadas con GOLPH3-WT, con algunos casos de pérdida de la integridad de membrana (Figura 11A y B flechas naranjas)

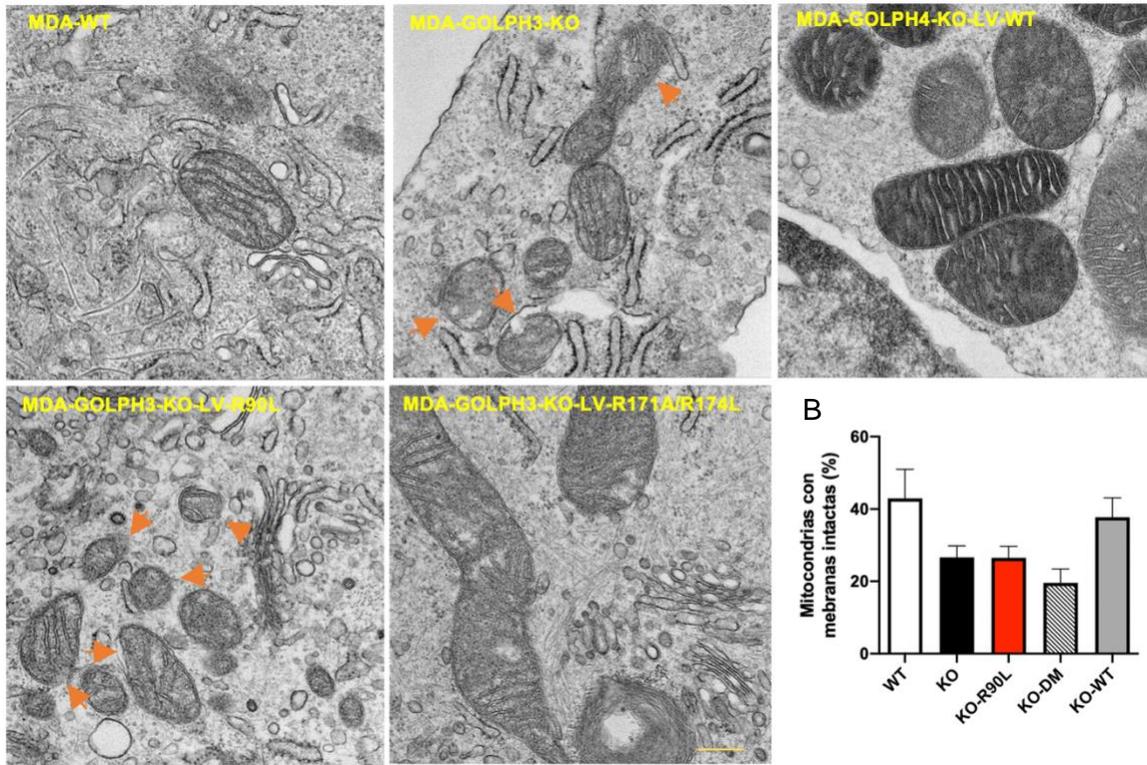
Estos cambios observados en la estructura de las mitocondrias, en cuanto a la pérdida de la integridad de membrana mitocondrial y de crestas mitocondriales en las células MDA-GOLPH3-KO, sugieren un rescate de la función mitocondrial en las células MDA-GOLPH3-KO-LV-WT, y una alteración en la función bioenergética en las células rescatadas con GOLPH3-R90L o GOLPH3-R171A/R174L.

Los cambios observados en las células GOLPH3-R171A/R174L y GOLPH3-R90L, tanto en la localización de las mitocondrias como en la integridad de la membrana mitocondrial, y la electrodensidad de las mitocondrias, sugieren una posible alteración de la función mitocondrial. Efectivamente, estudios han mostrado que la localización perinuclear de las mitocondrias provocado por estrés térmico genera una disminución en los niveles de ATP y el potencial de membrana mitocondrial, sugiriendo un daño en la función mitocondrial (Agarwal & Ganesh, 2020). En base a este antecedente, se evaluó si existía una disminución de la función de las mitocondrias en las células GOLPH3-R171A/R174L y GOLPH3-R90L. Para responder esta pregunta, se midió el contenido de ATP y el consumo de oxígeno en las líneas MDA- MDA-GOLPH3-KO, MDA-GOLPH3-KO-LV-vacío y las rescatadas MDA-GOLPH3-KO-LV-R90L y MDA-GOLPH3-KO-LV-R171A/R174L. Al igual que lo observado anteriormente (Figura 2B), las células MDA-GOLPH3-KO presentaron una disminución en el contenido de ATP y del consumo de oxígeno con respecto a las células MDA-WT, y, de acuerdo a lo esperado, las células MDA-GOLPH3-KO-LV-vacío se comportaron de manera similar a las células MDA-GOLPH3-KO (Figura 11D). Las células rescatadas con la mutante GOLPH3-R90L presentaron una tendencia a la disminución del contenido de ATP del 11,4% comparadas con las células rescatadas con la versión GOLPH3-WT (Figura 11D). Sin embargo, las células rescatadas con la mutante GOLPH3-R171A/R174L presentaron una disminución mayor del contenido de ATP y del consumo de oxígeno comparadas con las células rescatadas con GOLPH3-WT (Figura 11D y E).

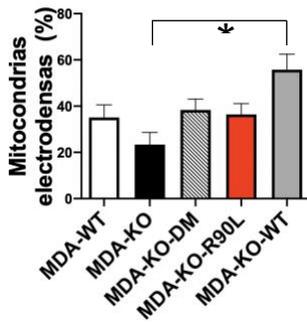
En base a estos resultados, se puede concluir que las células que expresan las distintas variantes de GOLPH3, es decir las células MDA-GOLPH3-KO-LV-R90L y MDA-GOLPH3-KO-LV-R171A/R174L, se comportan de manera distinta en cuanto al rescate de la función mitocondrial, ya que las células MDA-GOLPH3-KO-LV-R90L logran rescatar casi de manera completa el contenido de ATP y el consumo de oxígeno comparadas con las células MDA-WT. Sin embargo, las células MDA-GOLPH3-KO-LV-R171A/R174L no rescatan el contenido de ATP ni el consumo de oxígeno comparadas con las células MDA-WT. Por lo tanto, las variantes de

GOLPH3 podrían estar afectando de manera diferente la función bioenergética mitocondrial, sugiriendo que esto podría deberse en parte a cambios específicos producidos por las distintas sustituciones de aminoácidos que podrían entregarle una ganancia o pérdida de función diferencial a la proteína.

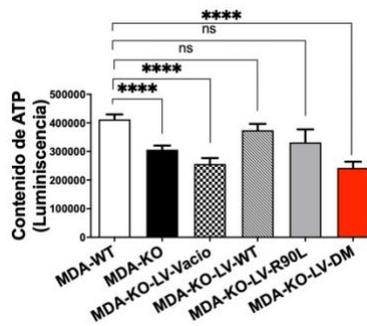
A



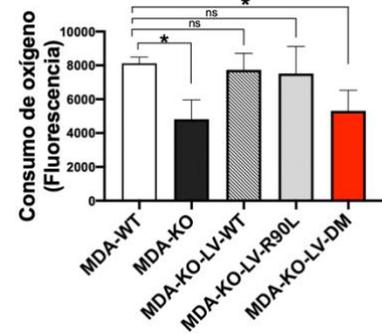
C



D



E



**Figura 11. Células MDA-MB-231 depletadas de GOLPH3 y rescatadas con las distintas versiones muestran cambios en la integridad de las membranas mitocondriales, electrodensidad y función bioenergética.** (A) Se tomaron distintas imágenes de las mitocondrias de las distintas líneas celulares mediante microscopía electrónica de transmisión. Magnificación 22000 x. Las flechas rojas indican pérdida de integridad de la membrana mitocondrial. Las flechas naranjas indican pérdida de las crestas mitocondriales. (B) Cuantificación del estado intacto de las membranas mitocondriales y (C) análisis estadístico de la electrodensidad mitocondrial. (D y E) Contenido de ATP y consumo de oxígeno, respectivamente. \*WT: MDA-WT, KO: MDA-GOLPH3-KO, vacío: MDA-GOLPH3-KO-LV-vector-vacío, KO-WT: MDA-GOLPH3-KO-LV-WT, KO-R90L: MDA-GOLPH3-KO-LV-R90L, LV-DM, MDA-GOLPH3-KO-LV-R171A/R74L.

Como resumen del objetivo 2 es posible concluir que las células MDA-GOLPH3-KO presentaron cambios tanto en la morfología como en la función mitocondrial. Esto indica que GOLPH3 sí posee un efecto sobre las mitocondrias en las células MDA-MB-231. En base a esto, la localización de GOLPH3 es igual de importante para la función mitocondrial. Su deslocalización del AG, sugerido por la expresión de las mutantes GOLPH3-R90L y GOLPH3-R171A7/R174L, generaron cambios en la localización de las mitocondrias, observándose una localización perinuclear, y en el caso de la mutante GOLPH3-R171A7/R174L se observa una disminución en la función bioenergética, reflejado en una disminución en el contenido de ATP y en el consumo de oxígeno.

En resumen, los resultados de los dos objetivos específicos mostraron que la depleción de GOLPH3 reduce la función bioenergética de las mitocondrias, observándose además mitocondrias más fragmentadas comparadas con la red mitocondrial de las células MDA-WT. El cambio en la morfología mitocondrial podría deberse a la posible función de GOLPH3 en la fisión mitocondrial. Además, el rescate con las variantes de GOLPH3 que no se localizan en el AG generaron una morfología mitocondrial distinta, con una localización perinuclear, a diferencia de las células MDA-WT. Por lo tanto, las variantes podrían tener una ganancia de función en el citosol, como, por ejemplo, estar interactuando con proteínas citosólicas que pudiesen tener un efecto sobre las mitocondrias. Con respecto a la función bioenergética, las dos variantes se comportan de manera distinta, por lo tanto, esto sugiere que la localización de GOLPH3 en el AG sí es necesaria para la localización y morfología mitocondrial, pero no necesariamente para su función bioenergética.

## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 GOLPH3 y su posible función en la fisión mitocondrial.

Un artículo científico publicado por Nagashima y sus colaboradores (2020) muestra que vesículas que contienen PI4P provenientes del AG podrían tener una función en la fisión mitocondrial. Este estudio observó que estas vesículas se localizan en los sitios de fisión después de la llegada de DRP1, sugiriendo una posible función en el último estadio de la fisión mitocondrial (Nagashima et al., 2020). Otro estudio mostró que actina polimeriza en sitios de contacto entre estas vesículas y las mitocondrias, causando fisión mitocondrial (Duan et al., 2023). Los autores observaron que al aumentar los niveles de PI4P provenientes del AG aumenta la polimerización de actina, reduciendo el largo de las mitocondrias, sugiriendo que la polimerización de actina a través de vesículas que contienen PI4P podrían estar involucradas en este proceso de fisión mitocondrial (Duan et al., 2023). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce qué otro papel podría estar cumpliendo el PI4P en la fisión mitocondrial. Una posibilidad podría ser que el PI4P sirviera, por ejemplo, para llevar efectores que contribuyan en este proceso. En base a esto, y como GOLPH3 interactúa con PI4P en el AG, se estudió en células vivas si GFP-GOLPH3 pudiese localizarse en sitios de fisión mitocondrial. Interesantemente, observamos que GFP-GOLPH3 en células HeLa se localiza en sitios de fisión mitocondrial colocalizando con YFP-DRP1 durante el evento de fisión. Aunque no detectamos GFP-GOLPH3 en todos los eventos de fisión mitocondrial, nuestras observaciones sugieren que GOLPH3 podría tener una función en la fisión mitocondrial. Por otro lado, será importante dilucidar si GOLPH3 está asociado a las vesículas que contienen PI4P provenientes del AG que llegan a los sitios de fisión mitocondrial, o si GOLPH3 citosólico puede asociarse a esas vesículas durante los eventos de fisión de manera independiente a su localización inicial en el AG, o si su presencia en esos sitios es independiente de PI4P. Para resolver estas preguntas se podrían hacer ensayos de video microscopía de

fluorescencia en células vivas transfectando GFP-GOLPH3 y un reportero que interactúe con PI4P, como mCherry-PH<sup>FAPP1</sup>. Para determinar si la presencia de GOLPH3 en los eventos de fisión mitocondrial es dependiente de PI4P, se podrían diseñar experimentos de video microscopía de fluorescencia con las mutantes de GOLPH3 que pierden su asociación a PI4P. Para determinar si las vesículas del AG que se asocian a los sitios de fisión mitocondrial tienen asociado GOLPH3, se podría diseñar otro experimento de video microscopía de fluorescencia utilizando GOLPH3 fusionado a la variante fotoactivable de GFP haciendo un pulso de iluminación en la zona del aparato de Golgi y observando la caza en las mitocondrias.

Ahora la pregunta que surge es cómo GOLPH3 podría estar cumpliendo alguna función en este evento de fisión mitocondrial. Se conoce que actina también está involucrada en este proceso, ayudando a la constricción de las mitocondrias en conjunto con DRP1. En base a esto, y como GOLPH3 interactúa con MYO18A y a su vez con los filamentos de actina (Buschman et al., 2015), podría ser un buen candidato como una proteína mediadora entre actina y las mitocondrias.

## 5.2 La depleción de GOLPH3 en células MDA-MB-231 promueve la fragmentación de la red mitocondrial sin cambios proteicos asociadas a fisión y fusión.

Como nuestros resultados sugieren que GOLPH3 podría estar involucrado en algún paso de la fisión mitocondrial, se evaluó si la depleción de esta proteína podría causar cambios en la red mitocondrial. Si la función de GOLPH3 fuese favorecer la constricción del túbulo mitocondrial durante la fisión, se esperaría encontrar que la depleción de GOLPH3 cause una red mitocondrial más interconectada. Sin embargo, observamos que el KO de GOLPH3 en células MDA-MB-231 presenta una disminución en el volumen y un aumento en el número de mitocondrias que sugiere una mayor fragmentación mitocondrial, comparado con la línea MDA-MB-231 WT que muestra mitocondrias con un mayor volumen que se relacionaría con una mayor interconexión entre ellas. En base a esta observación, proponemos que GOLPH3 podría tener una función de interrupción de la fisión mitocondrial (como un "stop"). Es decir, la llegada de GOLPH3 en el último estadio de la fisión, y después de la constricción por DRP1 y actina, podría ser una señal para que la fisión se detenga, y por lo tanto, al no estar presente GOLPH3 esta señal "stop" se pierde, ocurriendo un aumento en la fisión mitocondrial. Hay pocos estudios que muestren cómo es el término de la fisión o qué señales se necesitan. Un estudio mostró que la interacción de DRP1 con ácido fosfatídico inhibe la hidrólisis de GTP estimulada por su oligomerización, sugiriendo que el ácido fosfatídico podría controlar la activación de DRP1 después de la fisión mitocondrial (Adachi et al., 2016). GOLPH3 podría participar durante esta etapa inhibiendo o secuestrando algún actor molecular después de la fisión mitocondrial, teniendo como resultado una modulación negativa de la fisión. Sin embargo, no se podría descartar que las células MDA-MB-231 depletadas de GOLPH3 hayan ejercido una especie de compensación frente a la pérdida de GOLPH3, generando un desbalance en el equilibrio de la fisión y/o fusión mitocondrial, observándose mitocondrias más fragmentadas, y que fisiológicamente GOLPH3 tenga otra función durante el

proceso de fisión. Para evaluar esto, se podría diseñar un experimento en el que se observen los eventos de fisión mediante análisis en célula viva comparando células depletadas de GOLPH3 con células WT, con el fin de detectar si se observan mitocondrias más fragmentadas o no. O de lo contrario, sobreexpresando a GOLPH3. Si GOLPH3 actúa como un “*stop*” en el proceso de fisión mitocondrial, las mitocondrias se deberían observar más interconectadas. Al respecto, nuestros experimentos de rescate con GOLPH3-WT en células depletadas de GOLPH3 sugieren esta posibilidad. Pero si GOLPH3 tiene otra función, por ejemplo, como un mediador entre actina y DRP1, se deberían observar mitocondrias más fragmentadas. Otro ensayo podría ser la inhibición de DRP1, por ejemplo, con Mdivi, el cual es un inhibidor reversible de DRP1. Como es un inhibidor reversible, se podría inhibir DRP1 y analizar su efecto en las mitocondrias mediante video microscopía de fluorescencia en células vivas; luego se deberían hacer lavados con el fin de revertir la inhibición y así observar qué ocurre con GOLPH3 en las mitocondrias que están más interconectadas. Otra herramienta útil hubiese sido la técnica de *knocksideways* (Robinson & Hirst, 2013). Sería interesante analizar los eventos de fisión mitocondrial mediante la deslocalización de GOLPH3 hacia otro organelo y así observar si la red mitocondrial se observa más fragmentada o interconectada, y si se reestablece la red al relocalizar GOLPH3 en el AG. Otro estudio podría ser localizando de manera artificial en las mitocondrias alguna fosfatidilinositol 4 quinasa (PI4K) con la técnica *knocksideways* que permite la deslocalización de proteínas mediante la heterodimerización inducida por rapamicina (Robinson & Hirst, 2013). Esto permitiría aumentar la concentración de PI4P en las mitocondrias, y así analizar si se recluta más GOLPH3 a las mitocondrias y si esto se correlaciona con cambios en el estado de la red mitocondrial (más fragmentada).

También ha sido descrito que un aumento en la fragmentación mitocondrial podría deberse a un desbalance en la fisión, principalmente por una disminución en la tasa de fusión mitocondrial (Twig & Shirihai, 2011). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los niveles de MFN1, MFN2 y OPA1, todas proteínas de la maquinaria de fusión. Tampoco se observaron cambios en los

niveles de DRP1 total y fosforilado en serina 616, la cual es una fosforilación importante para la translocación de DRP1 desde el citosol hacia la membrana externa mitocondrial para ejercer su función en la fisión mitocondrial (Van der Bliek et al., 2013). Sin embargo, que no existan cambios en los niveles de DRP1 no necesariamente implica que no haya cambios en la fisión mitocondrial. Otra estrategia para evaluar posibles diferencias a nivel del proceso de fisión es evaluar el reclutamiento de DRP1 desde el citosol hacia la membrana externa mitocondrial. Este proceso es dependiente de la fosforilación de DRP1 en la serina 616 (Filichia et al., 2016). Para evaluar si la ausencia de GOLPH3 pudiera alterar el reclutamiento de DRP1 a la membrana de la mitocondria se podrían realizar ensayos de inmunofluorescencia indirecta analizando la colocalización de DRP1 con una proteína mitocondrial. Si GOLPH3 estuviese involucrado en este proceso debiéramos observar que células MDA-GOLPH3-KO presentan un mayor reclutamiento de DRP1 a la mitocondria. Sumado a ello, podríamos observar un menor pool de DRP1 a nivel citosólico, comparado con células WT (Cereghetti et al., 2008) Además, se ha descrito que DRP1 puede ser regulado no solo por fosforilaciones, sino que también por otras modificaciones post traduccionales, como s-nitrosilación (Cho et al., 2009). No se descarta que, aunque no se observan cambios en los niveles de DRP1 y en su estado de fosforilación, este pueda ejercer su función en la fisión mitocondrial mediante otro tipo de regulación. Además, otro estudio mostró una fisión mitocondrial independiente de DRP1 y de su estado de fosforilación. Este estudio demostró que el receptor de EGF (EGFR), a través de la unión con su ligando, podía traslocarse a la membrana externa de la mitocondria y regular la fisión mitocondrial al interactuar con MFN1 y así intervenir con su estado de polimerización (Che et al., 2015) Estudios en nuestro laboratorio mostraron que GOLPH3 puede regular a EGFR a través de la modulación de su fucosilación y ubiquitinación, y que su silenciamiento genera la acumulación de EGFR en compartimientos endo-lisosomales (Arriagada et al., 2020). En base a esto, no se descarta la idea de que EGFR pudiera verse alterado en las células MDA-GOLPH3-KO, siendo traslocado hacia las mitocondrias y finalmente estas ser fisionadas en un mecanismo dependiente de EGFR, más que de DRP1.

Como se ha observado que la localización de GOLPH3 en el aparato de Golgi depende de su interacción con PI4P, GOLPH3 podría estar localizado en otras membranas que contengan PI4P. Hasta la fecha no se ha descrito que las mitocondrias posean un *pool*/estable de PI4P, pero sí se ha descrito la presencia de su precursor, fosfatidilinositol (PI) (Zewe et al., 2020). Sin embargo, se ha descrito la presencia de fosfatidilinositol 4 quinasa (PI4K) en las membranas mitocondriales, sugiriendo la posibilidad de que bajo algún estímulo las mitocondrias pudieran producir PI4P (Nagashima et al., 2020). De hecho, se ha reportado que las mitocondrias necesitan de PI4P para poder fisionarse (Boutry & Kim, 2021; Nagashima et al., 2020). En base a esto, se podría sugerir que durante la fisión mitocondrial GOLPH3 podría estar localizado en la membrana mitocondrial y así ejercer una función relacionada con el proceso de fisión mitocondrial.

### 5.3 La ausencia de GOLPH3 en células MDA-MB-231 reduce la función bioenergética mitocondrial con un aumento de especies reactivas de oxígeno.

Como Nakashima y sus colaboradores observaron que el KD de GOLPH3 genera una disminución en la masa mitocondrial (Nakashima-Kamimura et al., 2005), y nuestro estudio observó que el KO de GOLPH3 genera una red mitocondrial más fragmentada, evaluamos si la depleción de GOLPH3 generaba otros efectos en las mitocondrias, como una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, en el contenido y producción de ATP, y en el consumo de oxígeno, lo que en conjunto se conoce como la bioenergética mitocondrial. Nuestros resultados muestran que células MDA-GOLPH3-KO presentan una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, comparado con las células MDA-WT. Para medir el potencial de membrana mitocondrial, se utilizó la sonda MitoTracker™ Red CMXRos, que es una versión reducida del Mitotracker. Este reactivo no es

fluorescente, pero fluoresce cuando es oxidado, lo que ocurre cuando la mitocondria está funcional (Kholmukhamedov et al., 2013). A pesar de que este reactivo es ampliamente utilizado para medir potencial de membrana mitocondrial, como es una versión reducida del Mitotracker, y debe ser oxidado para emitir fluorescencia, se podría estar midiendo la capacidad oxidativa de la célula, y solo el potencial de membrana mitocondrial. Por lo tanto, para complementar este resultado, se utilizó otra sonda, que es el TMRE, que es permeable y posee una carga negativa, acumulándose en las mitocondrias debido a su carga negativa relativa (Crowley et al., 2016).

Como el potencial de membrana mitocondrial generado por las bombas de protones es un componente esencial en el proceso de generación de energía por la fosforilación oxidativa (Zorova et al., 2018), se analizó si la disminución de este potencial causado por la depleción de GOLPH3 generaba una reducción en los niveles de ATP. Se observó que la depleción de GOLPH3 genera una disminución significativa en el contenido de ATP en un lisado total y en la producción de ATP mitocondrial comparado con las células MDA-WT, sugiriendo que la reducción de ATP observada pudiera ser en parte consecuencia de la disfunción mitocondrial. Tampoco se puede descartar que parte de la disminución del contenido de ATP se deba a una disminución en la glicólisis, a parte de una disminución en la producción de ATP por la fosforilación oxidativa. Para analizar esta posibilidad, se podría estudiar si la glicólisis también se ve afectada en las células MDA-GOLPH3-KO, comparada con las células MDA-WT. Considerando que la mayoría de las proteínas mitocondriales son de origen nuclear e importadas desde el citosol hasta la mitocondria (Stojanovski, et al. 2003), una posibilidad es que el *pool* citosólico de GOLPH3 tenga una función sobre estas proteínas. Interesantemente, en células de glioma humano U251 y mediante co-inmunoprecipitación se demostró que GOLPH3 interactúa con las proteínas citosólicas PHB1 y PHB2, que también se han observado asociadas a las mitocondrias (Wang et al., 2021). También se observó que el silenciamiento de GOLPH3 disminuye los niveles de PHB1 y PHB2 (Wang et al., 2021). Tanto PHB1 como PHB2 han sido relacionadas con la función mitocondrial (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2009). La depleción de PHB2 en células

MEF y HeLa provocan una disminución en los niveles de proteínas de las isoformas largas de OPA1 (proteína relacionada con la fusión de la membrana interna mitocondrial), resultando en un fenotipo mitocondrial fragmentado y desorganizado, similar a lo observado en nuestro estudio en las células KO de GOLPH3 (Kasashima et al., 2006; Merkwirth et al., 2008). Además, PHB1 y PHB2 tienen una función en la fosforilación oxidativa, donde se ha observado que el silenciamiento de PHB1 en células endoteliales reduce la actividad del Complejo I del transporte de electrones, aumentando los niveles de ROS (Schleicher et al., 2008). Además, resultados no publicados de nuestro laboratorio también han corroborado esta interacción mediante co-inmunoprecipitación entre GOLPH3 y PHB1 y PHB2 en células MDA-MB-231. Por esta razón sería interesante evaluar los niveles de PHB1 y PHB2 en células MDA-GOLPH3-KO. Niveles disminuidos o cambios en la localización de estas proteínas podrían explicar el fenotipo de fragmentación de mitocondrias y de disfunción mitocondrial.

Una de las funciones conocidas de GOLPH3 es mantener algunas glicosiltransferasas localizadas en el *trans*-Golgi (como POMGnT1, alfa 2,6 sialiltransferasa y C2GnT1) (Ali et al., 2012; Isaji et al., 2014; Pereira et al., 2014). Esto fue demostrado mediante un *knock-down* de GOLPH3 en distintas líneas celulares y mutando la cola citoplasmática de estas glicosiltransferasas, que es el motivo por el cual interactúan con GOLPH3. Se ha observado en células de glioblastoma que GOLPH3 modula la fucosilación de EGFR (Arriagada et al., 2020). También se ha observado en células HeLa que GOLPH3 modula la sialilación de  $\alpha 5$  integrina (Isaji et al., 2014). No se descarta que en las células MDA-MB-231 GOLPH3 también pueda estar cumpliendo la misma función. En base a esto, el KO de GOLPH3 también podría estar modificando el patrón de glicosilaciones de proteínas de superficie celular, como de integrina y EGFR y así estar afectando a las mitocondrias. Se ha observado que la vía de señalización integrina/FAK/pS727-STAT3 puede regular la función bioenergética de las mitocondrias a través de la regulación del potencial de membrana y el funcionamiento de la ETC (Visavadiya et al., 2016). No está muy claro cómo esta vía puede regular la función mitocondrial, pero otros estudios sugieren que STAT3 mantiene la función bioenergética a través

de la interacción con los complejos I, II y V (Gough et al., 2009); inhibiendo la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, impidiendo la disminución del potencial de membrana mitocondrial (Boengler et al., 2010). EGFR también se ha visto que tiene una función en las mitocondrias. Se ha observado que podría traslocarse a la membrana externa de la mitocondria y así regular la fisión mitocondrial al interactuar con MFN1 e intervenir con su estado de polimerización (Che et al., 2015). También se ha visto a EGFR localizado en la membrana interna mitocondrial (Boerner et al., 2004) y fosforilando a la subunidad COX2 del complejo II de la ETC (Demory et al., 2009) . Esta fosforilación causa una disminución en la actividad de COX2, conduciendo a una disminución en el nivel de ATP (Demory et al., 2009). Hasta la fecha no se ha visto que una modificación en el patrón de glicosilación de estas proteínas pueda afectar la función de las mitocondrias, pero sí podrían afectar en su señalización río abajo, pudiendo afectar el funcionamiento de las mitocondrias.

Análisis de interactoma de *Drosophila* mediante espectrometría de masa mostró que GOLPH3 podría interactuar con proteínas mitocondriales, como Tom22 y Tom40 (Sechi et al., 2021). Estas proteínas se encuentran localizadas en la membrana externa mitocondrial y cumplen una función en la translocación de proteínas citosólicas desde la membrana externa mitocondrial (Meisinger et al., 2001). Por lo tanto, sería interesante estudiar si esta interacción también ocurre en las células MDA-MB-231, en qué condiciones, y cuál sería su función. Otra opción es que GOLPH3 podría estar cumpliendo un rol directamente en el complejo TOM. Sería importante estudiar si la pérdida de interacción entre GOLPH3-TOM en *Drosophila* y/o en células de mamíferos, como las células MDA-MB-231, podría tener un efecto en el importe de proteínas citosólicas o en la estabilidad de formación de este complejo de importación. Por último, en base a la posible función de GOLPH3 como modulador negativo de la fisión mitocondrial, sugerida por nuestros resultados, la disfunción bioenergética observada en las células depletadas de GOLPH3 podría ser consecuencia del aumento en la fragmentación mitocondrial en estas células.

#### 5.4 El pool citosólico de GOLPH3 genera una red mitocondrial interconectada con una distribución hacia la zona perinuclear

En base a lo observado en las células depletadas de GOLPH3, nos preguntamos si el rescate de esta proteína, pero con la mutante de GOLPH3 que solo se localiza en el citosol, no en el AG, podría revertir de alguna forma los cambios en la red y función mitocondrial. En base a esto con pérdida de localización de GOLPH3 en el AG se observó que las células MDA-GFP-GOLPH3-R90L (que expresan GOLPH3 que solo se localiza en el citosol) presentan un aumento del volumen mitocondrial y una disminución en el número de mitocondrias, comparado con las células MDA-WT, pero con un fenotipo mitocondrial distinto al observado en las células MDA-GOLPH3-KO, caracterizado por la distribución de las mitocondrias a una zona perinuclear compacta. En base al fenotipo de localización perinuclear de las mitocondrias en presencia de GFP-GOLPH3-R90L, surge la pregunta ¿de qué forma GFP-GOLPH3-R90L podría estar generando este fenotipo? Al respecto, el transporte de las mitocondrias a través de la célula depende de los microtúbulos (Shen et al., 2018). Por lo tanto, se podría especular que la mutante citosólica GFP-GOLPH3-R90L altera de alguna manera la asociación de las mitocondrias a los microtúbulos, posiblemente a través de la acción de motores moleculares. Al respecto, se ha observado que la hipoxia genera un fenotipo mitocondrial similar al observado con la mutante GFP-GOLPH3-R90L. En este contexto, se ha visto que el silenciamiento de la cadena pesada del motor molecular dineína revierte el fenotipo mitocondrial (Al-Mehdi et al., 2012). Por lo tanto, sería interesante evaluar si el fenotipo mitocondrial que genera la expresión de GFP-GOLPH3-R90L pudiera ser dependiente de dineína u otros motores moleculares. Una explicación alternativa al fenotipo mitocondrial generado por la mutante GFP-GOLPH3-R90L, es que esta mutante pudiera afectar la interacción de GOLPH3 con la miosina no convencional MYO18A, y a su vez con el citoesqueleto de actina. Estudios han mostrado que el *knock-down* de GOLPH3 tiene un efecto en la morfología del AG en distintas líneas celulares, en donde los autores concluyen que GOLPH3 se une a PI4P del *trans*-Golgi y a su vez interacciona con MYO18A. Esto genera una fuerza

tensil requerida para una eficiente formación de vesículas y túbulos del AG, pero también para su morfología (Dippold et al., 2009). Además, se ha observado que el silenciamiento de otra miosina, la miosina 19, genera un fenotipo similar de mitocondrias perinucleares compactas (Oeding et al., 2018). Por lo tanto, si en el modelo celular utilizado en esta tesis (MDA-MB-231), MYO18A estuviera generando un efecto en la morfología del AG, la mutante GFP-GOLPH3-R90L podría perder su interacción con MYO18A debido a su pérdida de asociación con el AG, pudiendo conducir a una reducción en los niveles de MYO18A por desestabilización, generando un fenotipo similar a lo observado en la ausencia de miosina 19. Sería interesante estudiar los niveles de MYO18A entre las células GOLPH3-WT y GFP-GOLPH3-R90L y además, la interacción de esta mutante con MYO18A. Otra miosina descrita en tener una función en las mitocondrias, es la miosina 2 (MYO2), la cual es esencial para el movimiento de las levaduras. Una mutación en el sitio de unión al cargo, genera un defecto en la distribución de las mitocondrias (Förtsch et al., 2011). Por lo tanto, no se descarta que GOLPH3 pudiese estar interactuando con otras miosinas que estén involucradas en el movimiento de las mitocondrias, como MYO2, y al depletar las células de GOLPH3, se pierda esta interacción, afectando al movimiento de las mitocondrias.

#### 5.5 La expresión de GOLPH3 en el citosol reduce la disfunción mitocondrial inducida por la ausencia de GOLPH3.

Estudios han mostrado que la localización perinuclear de las mitocondrias generado por estrés térmico provoca una disminución en los niveles de ATP y el potencial de membrana mitocondrial, sugiriendo un daño en la función mitocondrial (Agarwal & Ganesh, 2020). En base a este antecedente, se estudió si la localización mitocondrial perinuclear observada con TOM20 en las líneas celulares MDA-GOLPH3-KO-LV-R90L y en MDA-GOLPH3-KO-LV-R171A/R174L podría alterar la función de las mitocondrias. Las células MDA-GOLPH3-KO presentaron una disminución en el contenido y producción de ATP con respecto a las células MDA-WT. Interesantemente, las células MDA-GOLPH3-KO-LV-R90L presentaron una

recuperación en el contenido de ATP comparada con las células MDA-GOLPH3-KO, ya que presenta niveles de ATP similares a los observados en las células MDA-WT. Sin embargo, las células MDA-GOLPH3-KO-LV-R171A/R174L presentan una disminución en el contenido de ATP de manera significativa con respecto a las células MDA-GOLPH3-WT. La pregunta es por qué la mutante GOLPH3-R171A/R174L genera una mayor disminución en el contenido de ATP que la mutante GOLPH3-R90L. Se podría sugerir cambios en la estructura de la proteína, al ser cambiar los residuos R171A y R174L podrían estar ejerciendo un efecto de ganancia de función o de pérdida de función, que no se genera con la mutación en el residuo R90. Además, se observaron cambios de la integridad de las membranas mitocondriales en las células MDA-GOLPH3-KO y en las células rescatadas con las versiones mutantes de GOLPH3. Diversos estudios han mostrado que la integridad de las crestas mitocondriales es importante para la función mitocondrial. Una de las proteínas más importantes en cuanto a la formación y mantención de las crestas mitocondriales es OPA1. Estudios en células MEFs depletadas de OPA1 muestran mitocondrias fragmentadas, una disminución en las crestas mitocondriales y una disminución en los contactos de las crestas, mostrando crestas desordenadas y torcidas (Chao Hu et al., 2020). Sin embargo, este estudio no muestra si la alteración de las crestas mitocondriales por la depleción de OPA1 podría afectar la función de las mitocondrias. Otro estudio en células MEFs mostró que la actividad GTPasa de OPA1 es esencial para el mantenimiento de las crestas mitocondriales, pero también para su función bioenergética, observándose en geles nativos y en células depletadas de OPA1 una disminución en los niveles de los complejos respiratorios, a excepción del complejo I, correlacionado con una disminución en la formación de crestas mitocondriales (Lee et al., 2017). En las células MDA-GOLPH3-KO no se observaron cambios significativos en los niveles de proteína de OPA1 comparado con las células MDA-WT, pero sería interesante analizar estos niveles en las células rescatadas con las distintas versiones de GOLPH3. A parte de OPA1, se conoce que cardiolipina también está involucrada en la formación de la curvatura de las crestas mitocondriales (Ikon & Ryan, 2017). Más aún, estudios realizados con pacientes con el síndrome de Barth, que tienen niveles de cardiolipina disminuidos,

muestran una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Xu et al., 2005); también se ha observado que mantiene ensamblados los complejos III y IV (Pfeiffer et al., 2003), entre otros. Nakashima y sus colaboradores evidenciaron que GOLPH3 podría regular los niveles de cardiolipina (Nakashima-Kamimura et al., 2005). Hasta la fecha, no se conoce cómo esta proteína pudiese estar regulando los niveles de cardiolipina. Sin embargo, se ha observado que la oxidación de la cardiolipina en cadenas de acilo insaturadas por un aumento del ROS puede interrumpir su interacción con otras proteínas, afectando así la función mitocondrial (Jiang et al., 2022). Un estudio muestra una disminución en la actividad del complejo I en un 25% en mitocondrias aisladas de corazón de rata con isquemia, un 48% en la reperfusión y un aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno, comparado con los controles. También observaron una disminución del contenido de cardiolipina de un 28% en isquemia y un 50% en la reperfusión. La actividad del complejo I fue restaurada por completo cuando se añadió cardiolipina de manera exógena, pero no cuando se agregó cardiolipina peroxidasa. En base a estos antecedentes, los autores proponen que la disminución de la actividad del complejo I podría atribuirse a un daño en la cardiolipina inducida por el aumento de ROS (Paradies et al., 2004). Como se observa un aumento de ROS en células MDA-GOLPH3-KO, se podría especular que el cambio en la morfología mitocondrial podría atribuirse a una alteración de la cardiolipina por el ROS producido, y así estar generando cambios en las crestas mitocondriales, y cambios en la función mitocondrial.

Otra pregunta es si la localización perinuclear de las mitocondrias observadas con el rescate de las mutantes de GOLPH3 citosólicas pudiese afectar los eventos de fisión mitocondrial. Los resultados que muestran una posible función de GOLPH3 en los eventos de fisión mitocondrial no permiten discriminar qué *pool* de GOLPH3, el asociado a AG o el citosólico, o ambos, estarían asociados a una función en estos eventos. Al respecto ¿cuál podría ser el requerimiento simultáneo de ambos *pools* de GOLPH3? Se podría especular que la localización del túbulo mitocondrial, perinuclear o periférico, podría comandar el *pool* de GOLPH3 que se reclutaría,

desde el AG o el citosólico, respectivamente. Faltan experimentos que pudiesen demostrar si los dos *pools* de GOLPH3 son necesarios.

Por lo tanto, la depleción de GOLPH3 o su rescate en el citosol generaron cambios en las mitocondrias, tanto en la morfología, función y localización, que se vieron reflejados en mitocondrias más fragmentadas con un menor volumen, con una disminución en su función bioenergética y un aumento de ROS. La localización de GOLPH3 en las mitocondrias en los eventos de fisión sugiere que GOLPH3 podría tener una función directa y clave en mantener la morfología y función mitocondrial.

## 6 CONCLUSIONES

- GFP-GOLPH3 en células HeLa se localiza en sitios de fisión mitocondrial, colocalizando con YFP-DRP1, sugiriendo la participación directa de esta proteína en este evento.
- La depleción de GOLPH3 en células MDA-MB-231 modifica la morfología mitocondrial generando una red con menor volumen y aumento en el número de mitocondrias que podría corresponder a fragmentación mitocondrial.
- La depleción de GOLPH3 en células MDA-MB-231 reduce la función bioenergética mitocondrial generando una disminución en el contenido y producción de ATP, una disminución en el consumo de oxígeno y un aumento en los niveles de ROS.
- El pool de GOLPH3 en el citosol, es decir, las versiones GOLPH3-R90L y GOLPH3-R171A/R174L generan una localización mitocondrial perinuclear, distinta a la observada en las células MDA-MB-231 WT.
- La deslocalización de GOLPH3 en el AG usando la versión GOLPH3-R171A/R174L genera una disminución en el contenido de ATP celular y disminución en el consumo de oxígeno en comparación con las células MDA-MB-231 WT y la expresión de GOLPH3-R90L, sugiriendo que esta mutante no rescata la función mitocondrial.

Cabe destacar que los resultados del efecto de los niveles de expresión de GOLPH3 sobre la integridad de la red y función bioenergética mitocondrial fueron obtenidos utilizando la línea celular MDA-MB-231, la cual se caracteriza por tener un metabolismo glicolítico (Zare et al., 2021). Por lo tanto, sería interesante estudiar si la depleción de GOLPH3 también genera un cambio en la red mitocondrial y una disminución en la función bioenergética en un modelo celular que posea un metabolismo más oxidativo, como las células MCF7 (Zare et al., 2021).

Como conclusión general de esta tesis, se sugiere que GOLPH3 regula la red mitocondrial y su función, posiblemente por su participación en los eventos de fisión. Sin embargo, no se puede descartar la participación de GOLPH3 de manera indirecta en otros procesos que conlleven a una disminución en la función mitocondrial. Para que las mitocondrias tengan una correcta función es necesario GOLPH3 en el AG, ya que la mutante GOLPH3-R171A/R174L no rescata la función mitocondrial.

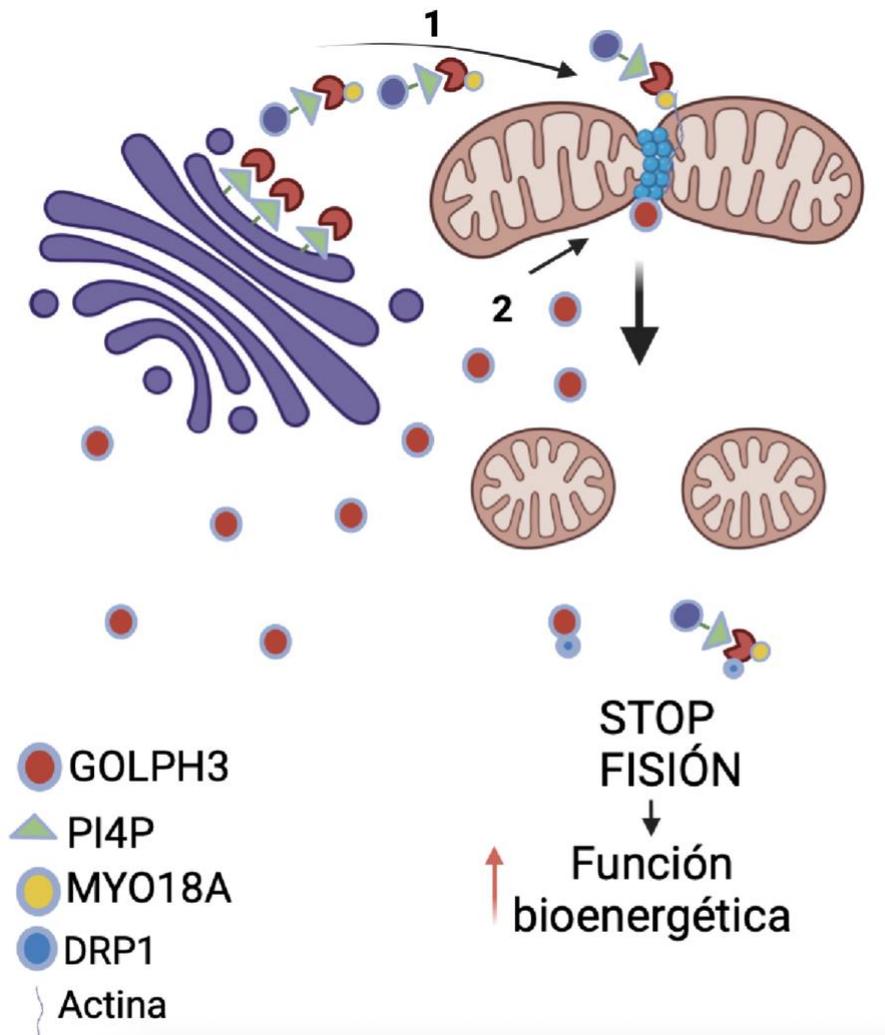
## 7. PROYECCIONES

Como se conoce que GOLPH3 tiene una función en el tráfico celular, sería interesante estudiar si la intervención en el tráfico, así como la depleción de GOLPH3, podría contribuir al fenotipo de disfunción y cambio en la morfología observado en las mitocondrias. Además, se conoce que GOLPH3 está involucrado en mantener algunas glicosiltransferasas localizadas en el AG, por lo tanto, se podría estudiar si los cambios en el patrón de glicosilación de proteínas de superficie en las células KD y/o KO de GOLPH3 cambia su señalización río abajo, afectando la función y/o morfología mitocondrial.

Otro punto importante es estudiar la contribución de GOLPH3 en la fisión mitocondrial, y si esta proteína se moviliza desde el AG hasta las mitocondrias en vesículas que contienen PI4P.

Finalmente, se podría estudiar si los cambios en la función y morfología mitocondrial observados en las células MDA-MB-231 depletadas de GOLPH3 y rescatadas con las distintas versiones citosólicas de GOLPH3 ejercen un efecto en la agresividad tumoral de estas células y de otros modelos celulares que sean más oxidativos (como la línea celular humana MCF7 de cáncer de mama) y en un modelo murino.

## 8. MODELO PROPUESTO



**Figura 12. Modelo propuesto.** Se sugiere que GOLPH3 desde el AG o desde el citosol tiene una función en los eventos de fisión mitocondrial, específicamente después de la llegada de DRP1. GOLPH3 podría ayudar a la fisión mitocondrial por ejemplo mediante su interacción con MYO18A (u otra miosina), y esta a su vez con los filamentos de actina, promoviendo la constricción del tubo. Además, después de la fisión mitocondrial, GOLPH3 podría tener una función “stop”, secuestrando proteínas relacionadas con la fisión mitocondrial, impidiendo que se genere otro evento de fisión y así manteniendo la función bioenergética mitocondrial.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abrisch, R. G., Gumbin, S. C., Wisniewski, B. T., Lackner, L. L. & Voeltz, G. K. (2020). Fission and fusion machineries converge at ER contact sites to regulate mitochondrial morphology. *Journal of Cell Biology*, 219(4). <https://doi.org/10.1083/JCB.201911122>
- Adachi, Y., Itoh, K., Yamada, T., Cervený, K. L., Suzuki, T. L., Macdonald, P., Frohman, M. A., Ramachandran, R., Iijima, M. & Sesaki, H. (2016). Coincident Phosphatidic Acid Interaction Restrains Drp1 in Mitochondrial Division. *Molecular Cell*, 63(6), 1034–1043. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.013>
- Agarwal, S. & Ganesh, S. (2020). Perinuclear mitochondrial clustering, increased ROS levels, and HIF1 are required for the activation of HSF1 by heat stress. *Journal of Cell Science*, 133(13). <https://doi.org/10.1242/jcs.245589>
- Ali, M. F., Chachadi, V. B., Petrosyan, A. & Chengs, P. W. (2012). Golgi phosphoprotein 3 determines cell binding properties under dynamic flow by controlling golgi localization of core 2 N-acetylglucosaminyltransferase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39564–39577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346528>
- Al-Mehdi, A. B., Pastukh, V. M., Swiger, B. M., Reed, D. J., Patel, M. R., Bardwell, G. C., Pastukh, V. V., Alexeyev, M. F. & Gillespie, M. N. (2012). Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Science Signaling*, 5(231). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002712>
- Andrés Juan, C., Manuel Pérez de la Lastra, J., Plou, F. J., Pérez-Lebeña, E. & Reinbothe, S. (2021). Molecular Sciences The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Antonny, B., Burd, C., De Camilli, P., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., Ford, M., Frolov, V. A., Frost, A., Hinshaw, J. E., Kirchhausen, T., Kozlov, M. M., Lenz, M., Low, H. H., McMahon, H., Merrifield, C., Pollard, T. D., Robinson, P. J., Roux, A. & Schmid, S. (2016). Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *The EMBO Journal*, 35(21), 2270–2284. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694613>

- Aquilano, K., Baldelli, S., Pagliei, B., Cannata, S. M., Rotilio, G. & Ciriolo, M. R. (2013). P53 orchestrates the PGC-1 $\alpha$ -mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(4), 386–399. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4615>
- Arriagada, C., Cavieres, V. A., Luchsinger, C., González, A. E., Muñoz, V. C., Cancino, J., Burgos, P. V. & Mardones, G. A. (2020). GOLPH3 regulates EGFR in T98G glioblastoma cells by modulating its glycosylation and ubiquitylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms21228880>
- Artal-Sanz, M. & Tavernarakis, N. (2009). Prohibitin and mitochondrial biology. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 20, Issue 8, pp. 394–401). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.04.004>
- Ashrafi, G. & Schwarz, T. L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 20, Issue 1, pp. 31–42). <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.81>
- Barr, F. A. & Short, B. (2003). Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 15, Issue 4, pp. 405–413). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00054-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00054-1)
- Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G. & Schulz, R. (2010). Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Research in Cardiology*, 105(6), 771–785. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0124-1>
- Boerner, J. L., Demory, M. L., Silva, C. & Parsons, S. J. (2004). Phosphorylation of Y845 on the Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Binding to the Mitochondrial Protein Cytochrome c Oxidase Subunit II. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16), 7059–7071. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.16.7059-7071.2004>
- Boutry, M. & Kim, P. K. (2021). ORP1L mediated PI(4)P signaling at ER-lysosome-mitochondrion three-way contact contributes to mitochondrial division. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25621-4>
- Buschman, M. D., Xing, M. & Field, S. J. (2015). The GOLPH3 pathway regulates Golgi shape and function and is activated by DNA damage. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 9, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00362>

- Calvo, S. E. & Mootha, V. K. (2010). The mitochondrial proteome and human disease. In *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (Vol. 11, pp. 25–44). <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141720>
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P. & Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, *458*(7241), 1056–1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
- Cereghetti, G. M., Stangherlin, A., Martins De Brito, O., Chang, C. R., Blackstone, C., Bernardi, P. & Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(41), 15803–15808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808249105>
- Chaban, Y., Boekema, E. J. & Dudkina, N. V. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1837, Issue 4, pp. 418–426). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.004>
- Che, T.-F., Lin, C.-W., Wu, Y.-Y., Chen, Y.-J., Han, C.-L., Chang, Y.-L., Wu, C.-T., Hsiao, T.-H., Hong, T.-M. & Yang, P.-C. (n.d.). *Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC* (Vol. 6, Issue 35). [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)
- Cho, D. H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z. & Lipton, S. A. (2009).  $\beta$ -Amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science*, *324*(5923), 102–105. <https://doi.org/10.1126/science.1171091>
- Clayton, D. A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. In *Human Reproduction* (Vol. 15). [https://academic.oup.com/humrep/article/15/suppl\\_2/11/619764](https://academic.oup.com/humrep/article/15/suppl_2/11/619764)
- Crowley, L. C., Christensen, M. E. & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring mitochondrial transmembrane potential by TMRE staining. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(12), 1092–1096. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087361>
- David, Y., Castro, I. G. & Schuldiner, M. (2021). The Fast and the Furious: Golgi Contact Sites. *Contact*, *4*, 251525642110344. <https://doi.org/10.1177/25152564211034424>
- Demory, M. L., Boerner, J. L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Hüttemann, M., Douglas, R., Haddad, G. & Parsons, S. J. (2009). Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(52), 36592–36604. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000760>

- Dippold, H. C., Ng, M. M., Farber-Katz, S. E., Lee, S. K., Kerr, M. L., Peterman, M. C., Sim, R., Wiharto, P. A., Galbraith, K. A., Madhavarapu, S., Fuchs, G. J., Meerloo, T., Farquhar, M. G., Zhou, H. & Field, S. J. (2009). GOLPH3 Bridges Phosphatidylinositol-4- Phosphate and Actomyosin to Stretch and Shape the Golgi to Promote Budding. *Cell*, 139(2), 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.052>
- Dolman, N. J., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Voronina, S. G., Petersen, O. H. & Tepikin, A. V. (2005). Stable Golgi-mitochondria complexes and formation of Golgi Ca<sup>2+</sup> gradients in pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15794–15799. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412694200>
- Duan, X., Wei, Y., Zhang, M., Zhang, W., Huang, Y. & Zhang, Y. H. (2023). PI4P-Containing Vesicles from Golgi Contribute to Mitochondrial Division by Coordinating with Polymerized Actin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/ijms24076593>
- El-Khamisy, S. F., Saifi, G. M., Weinfeld, M., Johansson, F., Helleday, T., Lupski, J. R. & Caldecott, K. W. (2005). Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature*, 434(7029), 108–113. <https://doi.org/10.1038/nature03314>
- Fernandez-Marcos, P. J. & Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4). <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001917>
- Filichia, E., Hoffer, B., Qi, X. & Luo, Y. (2016). Inhibition of Drp1 mitochondrial translocation provides neural protection in dopaminergic system in a Parkinson's disease model induced by MPTP. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep32656>
- Formosa, L. E. & Ryan, M. T. (2018). Mitochondrial OXPHOS complex assembly lines. *Nature Cell Biology*, 20(5), 511–513. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0098-z>
- Förtsch, J., Hummel, E., Krist, M. & Westermann, B. (2011). The myosin-related motor protein Myo2 is an essential mediator of bud-directed mitochondrial movement in yeast. *Journal of Cell Biology*, 194(3), 473–488. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012088>
- Frey Halling, J. & Pilegaard, H. (n.d.). *PGC-1 $\alpha$ -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications*. [www.nrcresearchpress.com](http://www.nrcresearchpress.com)

- Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J. & Voeltz, G. K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*, 334(6054), 358–362. <https://doi.org/10.1126/science.1207385>
- Funato, K. & Riezman, H. (2001). Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *Journal of Cell Biology*, 155(6), 949–959. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105033>
- Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J. T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S. H., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., Wu, Z. & Puigserver, P. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 $\alpha$ . *EMBO Journal*, 26(7), 1913–1923. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601633>
- Gough, D. J., Corlett, A., Schlessinger, K., Wegrzyn, J., Larner, A. C. & Levy, D. E. (2009). Mitochondrial STAT3 supports RasDependent oncogenic transformation. *Science*, 324(5935), 1713–1716. <https://doi.org/10.1126/science.1171721>
- Gureev, A. P., Shaforostova, E. A. & Popov, V. N. (2019). Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: Interaction between the Nrf2 and PGC-1 $\alpha$  signaling pathways. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 10, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00435>
- Herst, P. M., Rowe, M. R., Carson, G. M. & Berridge, M. V. (2017). Functional mitochondria in health and disease. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 8, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00296>
- Herzig S, Long F, Jhala U S, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B & Montminy M. (n.d.). *CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1*.
- Hu, Chao, Shu, L., Huang, X., Yu, J., Li, liuju, Gong, L., Yang, M., Wu, Z., Gao, Z., Zhao, Y., Chen, L. & Song, Z. (2020). OPA1 and MICOS Regulate mitochondrial crista dynamics and formation. *Cell Death and Disease*, 11(10). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03152-y>
- Hu, Chenxia, Huang, Y. & Li, L. (2017). Drp1-dependent mitochondrial fission plays critical roles in physiological and pathological progresses in mammals. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18010144>
- Hua, X., Yu, L., Pan, W., Huang, X., Liao, Z., Xian, Q., Fang, L. & Shen, H. (2012). Increased expression of Golgi phosphoprotein-3 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis of prostate cancer. *Diagnostic Pathology*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-127>

- Ikon, N. & Ryan, R. O. (2017). Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1859, Issue 6, pp. 1156–1163). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.013>
- Isaji, T., Im, S., Gu, W., Wang, Y., Hang, Q., Lu, J., Fukuda, T., Hashii, N., Takakura, D., Kawasaki, N., Miyoshi, H. & Gu, J. (2014). An oncogenic protein Golgi phosphoprotein 3 up-regulates cell migration via sialylation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20694–20705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.542688>
- Jä, S., Handschin, C., St.-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. (2007). *AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1*. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0705070104](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0705070104)
- Jara, C., Aránguiz, A., Cerpa, W., Tapia-Rojas, C. & Quintanilla, R. A. (2018). Genetic ablation of tau improves mitochondrial function and cognitive abilities in the hippocampus. *Redox Biology*, 18, 279–294. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.07.010>
- Jeong, S. H., Kim, H. K., Song, I. S., Noh, S. J., Marquez, J., Ko, K. S., Rhee, B. D., Kim, N., Mishchenko, N. P., Fedoreyev, S. A., Stonik, V. A. & Han, J. (2014). Echinochrome a increases mitochondrial mass and function by modulating mitochondrial biogenesis regulatory genes. *Marine Drugs*, 12(8), 4602–4615. <https://doi.org/10.3390/md12084602>
- Jiang, Z., Shen, T., Huynh, H., Fang, X., Han, Z. & Ouyang, K. (2022). Cardiolipin Regulates Mitochondrial Ultrastructure and Function in Mammalian Cells. In *Genes* (Vol. 13, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes13101889>
- Jornayvaz, F. R. & Shulman, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry*, 47, 69–84. <https://doi.org/10.1042/BSE0470069>
- Kane, L. A., Lazarou, M., Fogel, A. I., Li, Y., Yamano, K., Sarraf, S. A., Banerjee, S. & Youle, R. J. (2014). PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate parkin E3 ubiquitin ligase activity. *Journal of Cell Biology*, 205(2), 143–153. <https://doi.org/10.1083/jcb.201402104>
- Kar, U. P., Dey, H. & Rahaman, A. (2017). Regulation of dynamin family proteins by post-translational modifications. In *Journal of Biosciences* (Vol. 42, Issue 2, pp. 333–344). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9680-y>
- Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E. & Frennesson, C. I. (2010). What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochemical Journal*, 428(2), 183–190. <https://doi.org/10.1042/BJ20100208>

- Kasashima, K., Ohta, E., Kagawa, Y. & Endo, H. (2006). Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear translocation of pleiotropic human prohibitin 2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 36401–36410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605260200>
- Kashatus, J. A., Nascimento, A., Myers, L. J., Sher, A., Byrne, F. L., Hoehn, K. L., Counter, C. M. & Kashatus, D. F. (2015). Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Molecular Cell*, 57(3), 537–551. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.002>
- Kholmukhamedov, A., Schwartz, J. M. & Lemasters, J. J. (2013). Mitotracker probes and mitochondrial membrane potential. *Shock*, 39(6), 543. <https://doi.org/10.1097/shk.0b013e318292300d>
- Kulkarni-Gosavi, P., Makhoul, C. & Gleeson, P. A. (2019). Form and function of the Golgi apparatus: scaffolds, cytoskeleton and signalling. In *FEBS Letters* (Vol. 593, Issue 17, pp. 2289–2305). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13567>
- Kunigou, O., Nagao, H., Kawabata, N., Ishidou, Y., Nagano, S., Maeda, S., Komiya, S. & Setoguchi, T. (2011). Role of GOLPH3 and GOLPH3L in the proliferation of human rhabdomyosarcoma. *Oncology Reports*, 26(5), 1337–1342. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1413>
- Lee, H., Smith, S. B. & Yoon, Y. (2017). The short variant of the mitochondrial dynamin OPA1 maintains mitochondrial energetics and cristae structure. *Journal of Biological Chemistry*, 292(17), 7115–7130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762567>
- Levine, T. P. & Munro, S. (2002). Targeting of Golgi-Specific Pleckstrin Homology Domains Involves Both PtdIns 4-Kinase-Dependent and-Independent Components 4, and 5) to produce seven different phosphoinositides. By restricting the action of the individual kinases to a subset of membranes and in some cases coupling their action to activation by signaling pathways the cell is able to use specific phosphoinositides to control the. In *Current Biology* (Vol. 12). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>
- Li, X. Y., Liu, W., Chen, S. F., Zhang, L. Q., Li, X. G. & Wang, L. X. (2011). Expression of the Golgi phosphoprotein-3 gene in human gliomas: A pilot study. *Journal of Neuro-Oncology*, 105(2), 159–163. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0573-x>
- Liu, J., Huang, Y., Li, T., Jiang, Z., Zeng, L. & Hu, Z. (2021). The role of the Golgi apparatus in disease (Review). In *International Journal of Molecular Medicine*

(Vol. 47, Issue 4). Spandidos Publications.  
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4871>

- Ma, K., Chen, G., Li, W., Kepp, O., Zhu, Y. & Chen, Q. (2020). Mitophagy, Mitochondrial Homeostasis, and Cell Fate. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00467>
- Ma, Y., Wang, X., Wu, Y., Sun, B., Lv, H., Rong, F. & Zheng, X. (2014). Overexpression of GOLPH3 protein is associated with worse prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Tumor Biology*, 35(12), 11845–11849.  
<https://doi.org/10.1007/s13277-014-2411-1>
- Makhoul, C., Gosavi, P. & Gleeson, P. A. (2019). Golgi Dynamics: The Morphology of the Mammalian Golgi Apparatus in Health and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00112>
- Martínez-Reyes, I. & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. In *Nature Communications* (Vol. 11, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
- Maruyama, D., Hirata, N., Miyashita, R., Kawaguchi, R. & Yamakage, M. (2013). Substrate-dependent modulation of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria following in vitro hypoxia and reoxygenation injury. In *Exp Clin Cardiol* (Vol. 18, Issue 2).
- Mazzarello, P., Garbarino, C. & Calligaro, A. (2009). How Camillo Golgi became “the Golgi.” In *FEBS Letters* (Vol. 583, Issue 23, pp. 3732–3737). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.018>
- Meisinger, C., Ryan, M. T., Hill, K., Model, K., Lim, J. H., Sickmann, A., Müller, H., Meyer, H. E., Wagner, R. & Pfanner, N. (2001). Protein Import Channel of the Outer Mitochondrial Membrane: a Highly Stable Tom40-Tom22 Core Structure Differentially Interacts with Preproteins, Small Tom Proteins, and Import Receptors. *Molecular and Cellular Biology*, 21(7), 2337–2348.  
<https://doi.org/10.1128/mcb.21.7.2337-2348.2001>
- Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Löwer, B., Wunderlich, F. T., Von Kleist-Retzow, J. C., Waisman, A., Westermann, B. & Langer, T. (2008). Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes and Development*, 22(4), 476–488. <https://doi.org/10.1101/gad.460708>

- Mileykovskaya, E. & Dowhan, W. (2014). Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 179, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.012>
- Mookerjee, S. A., Gerencser, A. A., Nicholls, D. G. & Brand, M. D. (2017). Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements. *Journal of Biological Chemistry*, 292(17), 7189–7207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774471>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. In *Biochemical Journal* (Vol. 417, Issue 1, pp. 1–13). <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nagashima, S., Tábara, L.-C., Tilokani, L., Paupe, V., Anand, H., Pogson, J. H., Zunino, R., McBride, H. M. & Prudent, J. (n.d.). *Golgi-derived PI(4)P-containing vesicles drive late steps of mitochondrial division*. <http://science.sciencemag.org/>
- Nakashima-Kamimura, N., Asoh, S., Ishibashi, Y., Mukai, Y., Shidara, Y., Oda, H., Munakata, K., Goto, Y. I. & Ohta, S. (2005). MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. *Journal of Cell Science*, 118(22), 5357–5367. <https://doi.org/10.1242/jcs.02645>
- Oeding, S. J., Majstrowicz, K., Hu, X. P., Schwarz, V., Freitag, A., Honnert, U., Nikolaus, P. & Bähler, M. (2018). Identification of Miro1 and Miro2 as mitochondrial receptors for myosin XIX. *Journal of Cell Science*, 131(17). <https://doi.org/10.1242/jcs.219469>
- Ojas A. Deshpande & Shamim S. Mohiuddin. (2021). Biochemistry, Oxidative Phosphorylation. *Treasure Island (FL)*.
- Olesen, M. A., Torres, A. K., Jara, C., Murphy, M. P. & Tapia-Rojas, C. (2020). Premature synaptic mitochondrial dysfunction in the hippocampus during aging contributes to memory loss. *Redox Biology*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101558>
- Olson, B. L., Hock, M. B., Ekholm-Reed, S., Wohlschlegel, J. A., Dev, K. K., Kralli, A. & Reed, S. I. (2008). SCFCdc4 acts antagonistically to the PGC-1 $\alpha$  transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis. *Genes and Development*, 22(2), 252–264. <https://doi.org/10.1101/gad.1624208>
- Padman, B. S., Nguyen, T. N., Uoselis, L., Skulsuppaisarn, M., Nguyen, L. K. & Lazarou, M. (2019). LC3/GABARAPs drive ubiquitin-independent recruitment of

- Optineurin and NDP52 to amplify mitophagy. *Nature Communications*, 10(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08335-6>
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A. & Ruggiero, F. M. (2004). Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart: Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Circulation Research*, 94(1), 53–59. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000109416.56608.64>
- Parra, V., Eisner, V., Chiong, M., Criollo, A., Moraga, F., Garcia, A., Härtel, S., Jaimovich, E., Zorzano, A., Hidalgo, C. & Lavandero, S. (2008). Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovascular Research*, 77(2), 387–397. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm029>
- Pemberton, J. G., Kim, Y. J., Humpolickova, J., Eisenreichova, A., Sengupta, N., Toth, D. J., Boura, E. & Balla, T. (2020). Defining the subcellular distribution and metabolic channeling of phosphatidylinositol. *Journal of Cell Biology*, 219(3). <https://doi.org/10.1083/JCB.201906130>
- Peng, J., Fang, Y., Tao, Y., Li, K., Su, T., Nong, Y., Xie, F. & Lai, M. (2014). Mechanisms of GOLPH3 associated with the progression of gastric cancer: A preliminary study. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107362>
- Pereira, N. A., Pu, H. X., Goh, H. & Song, Z. (2014). Golgi phosphoprotein 3 mediates the Golgi localization and function of protein O-linked mannose  $\beta$ -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), 14762–14770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548305>
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L. & Schägger, H. (2003). Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52873–52880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308366200>
- Piantadosi, C. A. & Suliman, H. B. (2006). Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 324–333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508805200>
- Ren, K., Zhou, D., Wang, M., Li, E., Hou, C., Su, Y., Zou, Q., Zhou, P. & Liu, X. (2021). RACGAP1 modulates ECT2-Dependent mitochondrial quality control to drive breast cancer metastasis. *Experimental Cell Research*, 400(1). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112493>

- Rios, R. M. & Bornens, M. (2003). The Golgi apparatus at the cell centre. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 15, Issue 1, pp. 60–66). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00013-3)
- Robinson, M. S. & Hirst, J. (2013). UNIT 15.20 Rapid inactivation of proteins by Knocksideways. *Current Protocols in Cell Biology*, SUPPL.61. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1520s61>
- Rogov, V. V., Suzuki, H., Marinković, M., Lang, V., Kato, R., Kawasaki, M., Buljubašić, M., Šprung, M., Rogova, N., Wakatsuki, S., Hamacher-Brady, A., Dötsch, V., Dikic, I., Brady, N. R. & Novak, I. (2017). Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01258-6>
- Sarkar, S., Ali, M. Z. & Choubey, S. (2023). Efficacy of information transmission in cellular communication. *Physical Review Research*, 5(1). <https://doi.org/10.1103/physrevresearch.5.013092>
- Scarpulla, R. C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1813, Issue 7, pp. 1269–1278). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.019>
- Schleicher, M., Shepherd, B. R., Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Yu, J., Pan, Y., Acevedo, L. M., Shadel, G. S. & Sessa, W. C. (2008). Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. *Journal of Cell Biology*, 180(1), 101–112. <https://doi.org/10.1083/jcb.200706072>
- Scorrano, L., De Matteis, M. A., Emr, S., Giordano, F., Hajnóczky, G., Kornmann, B., Lackner, L. L., Levine, T. P., Pellegrini, L., Reinisch, K., Rizzuto, R., Simmen, T., Stenmark, H., Ungermann, C. & Schuldiner, M. (2019). Coming together to define membrane contact sites. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09253-3>
- Scott, K. L., Kabbarah, O., Liang, M. C., Ivanova, E., Anagnostou, V., Wu, J., Dhakal, S., Wu, M., Chen, S., Feinberg, T., Huang, J., Saci, A., Widlund, H. R., Fisher, D. E., Xiao, Y., Rimm, D. L., Protopopov, A., Wong, K. K. & Chin, L. (2009). GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer. *Nature*, 459(7250), 1085–1090. <https://doi.org/10.1038/nature08109>
- Sechi, S., Frappaolo, A., Belloni, G., Colotti, G. & Giansanti, M. G. (n.d.). Oncotarget 3493 [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget) The multiple cellular functions of the oncoprotein Golgi phosphoprotein 3. In *Oncotarget* (Vol. 6, Issue 6). [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)

- Sechi, S., Karimpour-Ghahnavieh, A., Frappaolo, A., Di Francesco, L., Piergentili, R., Schininà, E., D'Avino, P. P. & Giansanti, M. G. (2021). Identification of GOLPH3 partners in drosophila unveils potential novel roles in tumorigenesis and neural disorders. *Cells*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/cells10092336>
- Shen, J., Zhang, J. H., Xiao, H., Wu, J. M., He, K. M., Lv, Z. Z., Li, Z. J., Xu, M. & Zhang, Y. Y. (2018). Mitochondria are transported along microtubules in membrane nanotubes to rescue distressed cardiomyocytes from apoptosis article. *Cell Death and Disease*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0145-x>
- Snyder, C. M., Mardones, G. A., Ladinsky, M. S. & Howell, K. E. (2006). GMx33 associates with the trans-Golgi matrix in a dynamic manner and sorts within tubules exiting the Golgi. *Molecular Biology of the Cell*, 17(1), 511–524. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-07-0682>
- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. & Chan, D. C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *Journal of Cell Biology*, 178(5), 749–755. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704110>
- Stojanovski, et al. 2003. (n.d.).
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D. K., Bachoo, R. & Spiegelman, B. M. (2006). Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell*, 127(2), 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>
- Taft, M. H., Behrmann, E., Munske-Weidemann, L. C., Thiel, C., Raunser, S. & Manstein, D. J. (2013). Functional characterization of human myosin-18A and its interaction with F-actin and GOLPH3. *Journal of Biological Chemistry*, 288(42), 30029–30041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.497180>
- Tang, S., Yang, R., Zhou, X., Pan, H. & Liu, J. (2018). Expression of GOLPH3 in patients with non-small cell lung cancer and xenografts models. *Oncology Letters*, 15(5), 7555–7562. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8340>
- Tenorio, M. J., Ross, B. H., Luchsinger, C., Rivera-Dictter, A., Arriagada, C., Acuña, D., Aguilar, M., Cavieres, V., Burgos, P. V., Ehrenfeld, P. & Mardones, G. A. (2016). Distinct biochemical pools of Golgi phosphoprotein 3 in the human breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231. *PLoS ONE*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154719>

- Terradas, A. L., Zittlau, K. I., Macek, B., Fraiberg, M., Elazar, Z. & Kahle, P. J. (2021). Regulation of mitochondrial cargo-selective autophagy by posttranslational modifications. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 297, Issue 5). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101339>
- Torres, A. K., Jara, C., Olesen, M. A. & Tapia-Rojas, C. (2021). Pathologically phosphorylated tau at S396/404 (PHF-1) is accumulated inside of hippocampal synaptic mitochondria of aged Wild-type mice. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83910-w>
- Twig, G. & Shirihai, O. S. (2011). The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 14, Issue 10, pp. 1939–1951). <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3779>
- Valle, I., Álvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S. & Monsalve, M. (2005). PGC-1 $\alpha$  regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 66(3), 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.01.026>
- van der Blik, A. M., Shen, Q. & Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011072>
- Vazquez, F., Lim, J. H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C. B., Granter, S. R., Widlund, H. R., Spiegelman, B. M. & Puigserver, P. (2013). PGC1 $\alpha$  Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell*, 23(3), 287–301. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.020>
- Visavadiya, N. P., Keasey, M. P., Razskazovskiy, V., Banerjee, K., Jia, C., Lovins, C., Wright, G. L. & Hagg, T. (2016). Integrin-FAK signaling rapidly and potently promotes mitochondrial function through STAT3. *Cell Communication and Signaling*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0157-7>
- Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., De Vries, R. L. A., Kim, J., May, J., Tocilescu, M. A., Liu, W., Ko, H. S., Magrané, J., Moore, D. J., Dawson, V. L., Grailhe, R., Dawson, T. M., Li, C., Tieu, K. & Przedborski, S. (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 378–383. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911187107>
- Wang, K., Qi, Y., Wang, X., Liu, Y., Zhao, M., Zhou, D., Zhang, Y., Wang, Y., Yu, R. & Zhou, X. (2021). Original Article GOLPH3 promotes glioma progression by

- enhancing PHB2-mediated autophagy. In *Am J Cancer Res* (Vol. 11, Issue 5).  
[www.ajcr.us/](http://www.ajcr.us/)
- Wei, J. H. & Seemann, J. (2017). Golgi ribbon disassembly during mitosis, differentiation and disease progression. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 47, pp. 43–51). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.03.008>
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 12, pp. 872–884). <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- Wong, Y. C., Ysselstein, D. & Krainc, D. (2018). Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. *Nature*, 554(7692), 382–386. <https://doi.org/10.1038/nature25486>
- Wood, C. S., Schmitz, K. R., Bessman, N. J., Setty, T. G., Ferguson, K. M. & Burd, C. G. (2009a). PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking. *Journal of Cell Biology*, 187(7), 967–975. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909063>
- Wood, C. S., Schmitz, K. R., Bessman, N. J., Setty, T. G., Ferguson, K. M. & Burd, C. G. (2009b). PtdIns4P recognition by Vps74/GOLPH3 links PtdIns 4-kinase signaling to retrograde Golgi trafficking. *Journal of Cell Biology*, 187(7), 967–975. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909063>
- Wu, C. C., Taylor, R. S., Lane, D. R., Ladinsky, M. S., Weisz, J. A. & Howell, K. E. (2000). GMx33: A Novel Family of trans-Golgi Proteins Identified by Proteomics. In *Traffic* (Vol. 1). Munksgaard International Publishers.
- Xiang, Y. & Wang, Y. (2011). New components of the Golgi matrix. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 344, Issue 3, pp. 365–379). <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1166-x>
- Xu, Y., Sutachan, J. J., Plesken, H., Kelley, R. I. & Schlame, M. (2005). Characterization of lymphoblast mitochondria from patients with Barth syndrome. *Laboratory Investigation*, 85(6), 823–830. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700274>
- Xue, Y., Wu, G., Liao, Y., Xiao, G., Ma, X., Zou, X., Zhang, G., Xiao, R., Wang, X., Liu, Q., Long, D., Yang, J., Xu, H., Liu, F., Liu, M., Xie, K. & Huang, R. (2014). GOLPH3 is a novel marker of poor prognosis and a potential therapeutic target in human renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 110(9), 2250–2260. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.124>
- Yamano, K., Yatsukawa, Y. I., Esaki, M., Aiken Hobbs, A. E., Jensen, R. E. & Endo, T. (2008). Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in

- mitochondrial protein import. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 3799–3807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708339200>
- Yang, J. S., Lee, S. Y., Gao, M., Bourgoin, S., Randazzo, P. A., Premont, R. T. & Hsu, V. W. (2002). ARFGAP1 promotes the formation of COPI vesicles, suggesting function as a component of the coat. *Journal of Cell Biology*, 159(1), 69–78. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206015>
- Youle, R. J. & Van Der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. In *Science* (Vol. 337, Issue 6098, pp. 1062–1065). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
- Zare, M. E., Kansestani, A. N., Hemmati, S., Mansouri, K. & Vaisi-Raygani, A. (2021). *The rate of aerobic glycolysis is a pivotal regulator of tumor progression*. <https://doi.org/10.1007/s40200-021-00774-7>/Published
- Zewe, J. P., Miller, A. M., Sangappa, S., Wills, R. C., Goulden, B. D. & Hammond, G. R. V. (2020). Probing the subcellular distribution of phosphatidylinositol reveals a surprising lack at the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 219(3). <https://doi.org/10.1083/JCB.201906127>
- Zhang, L. J., Wang, K. B., Liu, L. shan, Chen, L. zhou, Peng, B. G., Liang, L. J., Li, Z., Xue, L., Li, W. & Xia, J. T. (2014). Overexpression of GOLPH3 is associated with poor prognosis and clinical progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-571>
- Zhang, X. & Wang, Y. (2016). GRASPs in Golgi structure and function. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 3, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00084>
- Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D. W., Abel, P. W. & Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*, 32(40), 4814–4824. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.494>
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J. & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, 552, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>