



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

**FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIA
PROGRAMA EN BIOLOGÍA CELULAR Y BIOMEDICINA
SEDE SANTIAGO**

**Cambios en el control transcripcional y en la actividad proteolítica de Lonp1
en el envejecimiento: Contribución a la disfunción mitocondrial en el
hipocampo por la acumulación de Tau PHF-1.**

Tesis presentada para obtener el grado académico de
Doctor en Biología Celular y Biomedicina

Tutor: Dr. Cheril Cecilia Tapia Rojas
Co-Tutor: Dr. Bredford Dennis Kerr Fuentes
Estudiante: Jesús Antonio Llanquinao Sandoval

© Jesús Antonio Llanquinao Sandoval

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

2024

EVALUACIÓN

En Santiago, el 11 de junio de 2024 los abajo firmantes dejan constancia que el estudiante Jesús Antonio Llanquinao Sandoval 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 calificación de 7,0 (siete coma cero).

Tutores:



Dra. Cheril Tapia Rojas

Universidad San Sebastián.



Dr. Bredford Kerr Fuentes

Universidad San Sebastián

Comisión evaluadora:



Dr. Álvaro Elorza

Universidad Andrés Bello



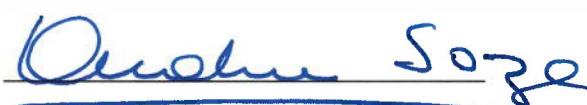
Dra. Paola Haeger

Universidad Católica del Norte



Dr. Carlos Lagos

Universidad San Sebastián



Dra. Andrea Soza

Universidad San Sebastián

Financiamiento

Este trabajo fue financiado con fondos de Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo del Gobierno de Chile (FONDECYT Nº 11170546, FONDECYT 1221178, PAI 77170091, Centro Ciencia & Vida FB210008, a Dra. Cheril Tapia Rojas y FONDECYT Nº 1230905 a Dr. Bredford Kerr Fuentes).

Jesús Llanquinao Sandoval fue financiado por el Programa de Becas para Estudiantes Doctorales de la Vicerrectoría de Investigación y Doctorados de la Universidad San Sebastián, Chile y por la Agencia ANID con su Programa de Becas de Doctorado Nacional 21212277, Beca de Extensión ANID 23220507 y Gastos Operacionales 24220202.

Agradecimiento

De manera muy especial a mis profesores tutores Dra. Cheril Tapia Rojas y Dr. Bredford Kerr, por guiarme en el camino doctoral, financiero y su respaldo para desarrollar este trabajo científico.

Agradezco a los profesores colaboradores, Dr. Andreas Schüller, Dr. Marcello Pinti y Dra. Marcela Sjöberg por su ayuda y facilitarme las herramientas en el desarrollo experimental.

Hago extensivo mis agradecimientos a la comisión evaluadora, Dr. Álvaro Elorza, Dra. Paola Haeger, Dr. Carlos Lagos y Dra. Andrea Soza por su ayuda, disposición, consejos en el trabajo experimental y aprendizaje académico.

Al equipo de trabajo del laboratorio por su amistad, ayuda y enriquecimiento intelectual, compuestos por Claudia Jara, Matías Lira, Angie Torres, Catalina Polanco, Alejandra Catenaccio, Daniela Cortes, Karina Cicali, Javiera Álvarez, Cristina Silva, Ariel Viveros, Claudia Narea y Fernanda Maturana.

Agradezco a Glorita y Don Javier por su buena disposición y alegría en el día a día.

Agradezco a la Universidad San Sebastián, CEBICEM y Profesores que fueron parte de mi formación doctoral, espacios y financiamiento.

Agradezco a mis compañeros del programa de doctorado por su ayuda, cariño y amistad.

Agradezco a mis padres, tía y hermanos, por su afecto, incondicionalidad y amor. Quiero agradecer especialmente a mi familia Alejandra y Amanda, por estar siempre junto a mí, por su cariño, apoyo y amor.

Tabla de contenidos

| | |
|--|-----------|
| 1. Resumen | 7 |
| 2. Abstract..... | 9 |
| 3. Introducción..... | 11 |
| 3.1 Planteamiento del problema | 11 |
| 3.2 Estado del arte..... | 12 |
| 3.2.1 Envejecimiento..... | 12 |
| 3.2.2 Lector y regulación transcripcional mediada por Mecp2..... | 15 |
| 3.2.3 Genes mitocondriales codificados en el núcleo y regulados por Mecp2 | 17 |
| 3.2.4 Regulación epigenética y transcripcional de Lonp1 | 17 |
| 3.2.5 Proteasa mitocondrial Lonp1..... | 19 |
| 3.2.6 Proteína Tau..... | 23 |
| 4.1 Hipótesis: | 27 |
| 4.2 Objetivo general: | 27 |
| 4.3 Objetivos específicos: | 27 |
| 5. Metodología, Materiales y Métodos..... | 28 |
| 5.1 Soluciones y tampones: | 28 |
| 5.2 Anticuerpos: | 29 |
| 5.3 Modelo animal: | 30 |
| 5.4 Extracción del hipocampo: | 31 |
| 5.5 Identificación de islas CpG del promotor del gen Lonp1:..... | 32 |
| 5.6 Modificación de ADN genómico por bisulfito de sodio:..... | 32 |
| 5.7 PCR de metilación específica: | 33 |
| 5.8 Expresión de genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real: | 33 |
| 5.9 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-Mecp2): | 34 |
| 5.10 Preparación de extractos de proteínas y Western Blot:..... | 37 |
| 5.11 Preparación de fracciones subcelulares del hipocampo:..... | 37 |
| 5.12 Inmunoprecipitación de las proteínas Lonp1 y Tau PHF-1:..... | 40 |
| 5.13 Ensayos de actividad proteolítica de Lonp1 por FITC-Caseína: | 40 |
| 5.14 Ensayos de degradación in vitro de Tau PHF-1:..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 5.15 Medición de la concentración de ATP: | 41 |
| 5.16 Preparación de rebanadas del hipocampo:..... | 41 |
| 5.17 Tratamiento con inhibidores de la actividad proteolítica de Lonp1:..... | 41 |
| 5.18 Análisis de los niveles de Tau PHF-1 en la mitocondria:..... | 42 |
| 5.19 Medición del potencial de membrana mitocondrial:..... | 42 |
| 5.20 Medición del consumo de oxígeno mitocondrial:..... | 42 |
| 5.21 Medición de la producción de ROS:..... | 43 |
| 5.22 Ensayo de medición de carga de proteínas desplegadas: | 43 |
| 5.23 Análisis estadístico:..... | 44 |
| 6. Resultados | 45 |
| 6.1 Predicción y niveles globales de metilación de islas CpG en la región promotora del gen Lonp1..... | 45 |
| 6.2 El gen codificador para la proteasa Lonp1 es blanco de regulación por Mcp2..... | 49 |
| 6.3 Niveles de proteína y estado de fosforilación de Mcp2 en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8. | 52 |
| 6.4 Análisis de expresión de la proteasa Lonp1 en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8. | 54 |
| 6.5 Disminución de los niveles proteicos y actividad proteolítica de Lonp1 en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos..... | 56 |
| 6.6 Acumulación de proteínas anómalas y sustratos de Lonp1 en mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos..... | 63 |
| 6.7 Acumulación de Tau PHF-1 en mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos. | 65 |
| 6.8 Tau fosforilada en Ser396 y Ser404 (PHF-1) se acumula en la mitocondria cuando se inhibe a la proteasa mitocondrial Lonp1..... | 67 |
| 6.9 Tau PHF-1 es un nuevo sustrato de la proteasa Lonp1. | 71 |
| 6.10 La acumulación de la proteína Tau PHF-1 en la mitocondria induce disfunción mitocondrial..... | 73 |
| 7. Discusión | 76 |
| 7.1 Metilación del ADN en el promotor de Lonp1 en el envejecimiento | 76 |
| 7.2 Regulación transcripcional de Lonp1 mediada por el factor de transcripción Mcp2 | 77 |

| | |
|--|------------|
| 7.3 Niveles de proteínas y actividad proteolítica de <i>Lonp1</i> en el hipocampo de ratones envejecidos..... | 78 |
| 7.4 Acumulación de proteínas anómalas en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos..... | 80 |
| 7.5 Tau PHF-1 nuevo sustrato de <i>Lonp1</i> y el efecto de la acumulación de Tau PHF-1 en mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos..... | 81 |
| 8. Conclusiones..... | 86 |
| 9. Proyecciones | 87 |
| 10. Anexos | 88 |
| Anexo 1: Caracterización de ratones SAMP8..... | 88 |
| Anexo 2: Análisis de las variantes de ARNm de la proteasa <i>Lonp1</i>..... | 90 |
| Anexo 3: Análisis de expresión y niveles de proteínas de la proteasa <i>Lonp1</i> en el hipocampo de ratones <i>Mecp2-KO</i> y <i>WT</i>..... | 93 |
| Anexo 4: Análisis bioinformático para el sitio de reconocimiento de la proteasa <i>Lonp1</i> y Docking Molecular de la proteína Tau PHF-1 en el sitio catalítico de <i>Lonp1</i>..... | 95 |
| 11 Bibliografía..... | 100 |

Lista de figuras

| | |
|--|-----------|
| Figura 1: Representación de la ruta de asistencia a la degradación de proteínas citoplasmáticas por la mitocondria..... | 22 |
| Figura 2: Hipótesis gráfica de la tesis doctoral..... | 26 |
| Figura 3: Secuencia del promotor y región río abajo del TSS de Lopn1..... | 35 |
| Figura 4: Estandarización de la fragmentación de la cromatina obtenida de hipocampo de los ratones SAMR1..... | 36 |
| Figura 5: Controles de purificación de las distintas fracciones subcelulares del hipocampo obtenidas por centrifugación diferencial. | 39 |
| Figura 6: Predicción de islas CpG en la región promotora y 5'UTR de Lopn1 en base a la secuencia de referencia <i>Mus Musculus</i>. | 46 |
| Figura 7: Aumento en la metilación global del promotor de Lopn1 en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos. | 48 |
| Figura 8: Interacción de Mecp2 con el promotor de Lopn1 en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8. | 51 |
| Figura 9: Disminución de los niveles de expresión y fosforilación de Mecp2 en ratones SAMP8 envejecidos. | 53 |
| Figura 10: Niveles de expresión de Lopn1 en hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8. | 55 |
| Figura 11: Disminución de los niveles proteicos de Lopn1 en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos. | 57 |
| Figura 12: Caracterización de la actividad proteolítica de Lopn1 del hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses..... | 61 |
| Figura 13: Acumulación de proteínas mal plegadas y sustratos de Lopn1 en ratones SAMR1 y SAMP8 de 7 meses..... | 64 |
| Figura 14: Tau PHF-1 aumenta en hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos. | 66 |
| Figura 15: La proteína Tau fosforilada en Ser396 y Ser404 (PHF-1) como potencial sustrato de la proteasa mitocondrial Lopn1..... | 68 |
| Figura 16: Efecto de la inhibición de la actividad proteolítica de Lopn1 sobre la función bioenergética mitocondrial. | 70 |
| Figura 17: Tau PHF-1 es un nuevo sustrato de la proteasa mitocondrial Lopn1. | 72 |
| Figura 18: Ensayo de importe mitocondrial <i>in vitro</i> en mitocondrias de ratones SAMP8 de 2 meses de edad..... | 74 |

Figura 19: Representación de los principales resultados obtenidos en este trabajo de tesis Doctoral 85

Lista de tablas

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1: Soluciones y tampones de trabajo. | 28 |
| Tabla 2: Listado de anticuerpos utilizados en este estudio..... | 29 |
| Tabla 3: Características reportadas en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8..... | 31 |
| Tabla 4: Secuencia de partidores para MSP-PCR..... | 32 |
| Tabla 5: Secuencia de partidores para PCR en tiempo real..... | 34 |
| Tabla 6: Secuencia de partidores para evaluar ChIP-Mecp2 por PCR tiempo real..... | 35 |
| Tabla 7: Parámetros de Lonp1 endógena obtenidas de la cinética de degradación del FITC-Caseína..... | 62 |
| Tabla anexo 2: Secuencia de partidores para PCR en convencional. | 92 |
| Tabla anexo 4: Predicción bioinformática de productos de corte proteolítico predichos de tau 2N4R por el método MEME..... | 99 |

1. Resumen

El envejecimiento se caracteriza por el deterioro de las funciones cerebrales, y en el hipocampo esto se asocia con la pérdida de memoria a avanzada edad. Dentro de los mecanismos que subyacen al deterioro cognitivo se encuentran los cambios epigenéticos, la disfunción mitocondrial y la acumulación de proteínas anómalas. La mitocondria posee proteasas de la superfamilia AAA+ como Lonp1, una serina peptidasa que mantiene el proteoma mitocondrial. Lonp1 es codificada por el gen nuclear *Lonp1* y este gen experimenta cambios de metilación en condiciones patológicas y ambientales, sugiriendo que el gen de *Lonp1* es regulado epigenéticamente, aunque no se conoce qué lector epigenético podría regular su expresión. Mecp2 es el lector epigenético más expresado en cerebro y que regula la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales. Se ha propuesto a la mitocondria como una ruta complementaria a la degradación de proteínas citoplasmáticas, sustratos del proteasoma, donde Lonp1 es clave. Lonp1 degrada proteínas citoplasmática como β-catenina y TDP-43, sugiriendo que otras proteínas anómalas son degradadas por Lonp1, como la proteína Tau fosforilada. Tau regula la dinámica de los microtúbulos mediante su estado de fosforilación. Sin embargo, cuando Tau se fosforila en residuos específicos incluyendo la Serina 396 y Serina 404 (epítope Tau PHF-1) esta se disocia de los microtúbulos, se acumula en el citoplasma y eventualmente forma agregados en un grupo de patologías conocidas como taupatías. Interesantemente, la sobreexpresión de una forma pseudofosforilada de Tau PHF-1 induce disfunción mitocondrial *in vitro*. Por el contrario, la delección de Tau mejora la función mitocondrial y las capacidades cognitivas en animales envejecidos. Tau se degrada principalmente por el proteasoma, y reportes de nuestro laboratorio muestran que Tau PHF-1 se acumula en las mitocondrias del hipocampo de ratones envejecidos y se correlaciona con disfunción mitocondrial; lo que sugiere a Tau PHF-1 como un candidato de degradación mitocondrial mediada por Lonp1, que podría acumularse debido a deficiencias en la actividad de esta proteasa, induciendo la disfunción mitocondrial. En base a estos antecedentes, propusimos la siguiente hipótesis: “Cambios en el control transcripcional de *Lonp1* mediados por *Mecp2* y en la actividad de esta proteasa en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos contribuyen a la disfunción mitocondrial inducida por la acumulación de Tau PHF-1 en

este organelo". Para probar esta hipótesis propusimos dos objetivos específicos: 1) Evaluar cambios en el control transcripcional de *Lonp1* mediados por *Mecp2* y en su actividad proteolítica en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 adultos y envejecidos; y 2) Determinar la disminución de la actividad proteolítica de *Lonp1* aumenta los niveles de Tau PHF-1 en la mitocondria, causando la disfunción mitocondrial en el hipocampo de ratones SAM no envejecidos. Para responder a estos objetivos, realizamos predicciones bioinformáticas de islas CpG y corroboramos los cambios de metilación del gen *Lonp1* por MSP-PCR; evaluamos la unión de *Mecp2* al promotor de *Lonp1* por ChIP-*Mecp2*, medimos los niveles proteicos y de fosforilación de *Mecp2* (lo que regulan su unión/disociación a los promotores de sus genes blanco); determinamos los niveles de ARNm de *Lonp1* por RT-qPCR y la actividad proteolítica de *Lonp1* por el kit FITC-Caseína. Además, evaluamos los niveles de Tau PHF-1 por Western blot; realizamos tratamientos ex-vivo inhibiendo la actividad proteolítica de *Lonp1* para determinar si esto promueve la acumulación de Tau PHF-1, y si esta acumulación induce disfunción mitocondrial; finalmente realizamos ensayos de degradación *in vitro* para evaluar si Tau PHF-1 es sustrato de *Lonp1*. Los resultados indican que aumenta la metilación del promotor de *Lonp1* en el envejecimiento, que *Lonp1* es gen blanco de *Mecp2*, y que en el envejecimiento hay menor unión de *Mecp2* al promotor de *Lonp1*, posiblemente como consecuencia de los reducidos niveles de *Mecp2* y de su fosforilación en Serina 80, lo que reduciría la unión de *Mecp2* a sus genes blanco. Por otra parte, los niveles de mRNA de *Lonp1* aumentan en el hipocampo envejecido, sugiriendo que *Mecp2* podría actuar como un represor transcripcional de *Lonp1*; pero, sorpresivamente, los niveles proteicos de *Lonp1* se reducen, de igual manera que su actividad proteolítica, por lo que a pesar de la regulación transcripcional inducida por *Mecp2*, probablemente existen otros mecanismos post-traduccionales y de degradación, aun desconocidos, que controlan la expresión proteica de *Lonp1* y su actividad degradativa en el envejecimiento. Finalmente, la inhibición de *Lonp1* promueve la acumulación de Tau PHF-1, ya que Tau PHF-1 es sustrato de *Lonp1*, y la acumulación de Tau PHF-1 induce disfunción mitocondrial. Así, concluimos que *Mecp2* regula transcripcionalmente a *Lonp1*, que la pérdida de función de *Lonp1* induce la acumulación de Tau PHF-1 y consecuentemente esto induce disfunción mitocondrial en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos.

2. Abstract

Aging is characterized by deterioration of brain functions, and in the hippocampus, this is associated with memory loss in older age. The mechanisms underlying cognitive decline include epigenetic changes, mitochondrial dysfunction, and the accumulation of abnormal proteins. Mitochondria possess AAA+ superfamily proteases such as Lonp1, a serine peptidase that maintains the mitochondrial proteome. Lonp1 is encoded by the nuclear gene Lonp1, and this gene undergoes methylation changes under pathological and environmental conditions, suggesting that the Lonp1 gene is epigenetically regulated, although it is not known which epigenetic reader might regulate its expression. Mecp2 is the most expressed epigenetic reader in the brain and regulates the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins. Mitochondria have been proposed as a complementary pathway for the degradation of cytoplasmic proteins, substrates of the proteasome, where Lonp1 is key. Lonp1 degrades cytoplasmic proteins such as β-catenin and TDP-43, suggesting that other abnormal proteins are degraded by Lonp1, such as phosphorylated Tau protein. Tau regulates microtubule dynamics through its phosphorylation state. However, when Tau is phosphorylated at specific residues, including at Serine 396 and Serine 404 (Tau epitope PHF-1), it dissociates from microtubules, accumulates in the cytoplasm, and eventually forms aggregates in a group of pathologies known as tauopathies. Interestingly, overexpression of a pseudophosphorylated form of Tau PHF-1 induces mitochondrial dysfunction *in vitro*. In contrast, Tau deletion improves mitochondrial function and cognitive abilities in aged animals. The proteasome mainly degrades Tau and reports from our laboratory show that Tau PHF-1 accumulates in hippocampal mitochondria of aged mice and that this correlates with mitochondrial dysfunction, suggesting Tau PHF-1 as a candidate for Lonp1-mediated mitochondrial degradation, which could accumulate due to deficiencies in the activity of this protease, ultimately inducing mitochondrial dysfunction. Based on this information, we proposed the following hypothesis: 'Changes in the transcriptional control of Lonp1 mediated by Mecp2 and in the activity of this protease in the hippocampus of aged SAMP8 mice contribute to mitochondrial dysfunction induced by the accumulation of Tau PHF-1 in this

organelle'. To test this hypothesis we proposed two specific objectives: 1) To evaluate changes in the transcriptional control of *Lonp1* mediated by *Mecp2* and its proteolytic activity in the hippocampus of adult and aged SAMR1 and SAMP8 mice; and 2) To determine whether decreased *Lonp1* proteolytic activity increases Tau PHF-1 levels in mitochondria, causing mitochondrial dysfunction in the hippocampus of non-aged SAM mice. To address these objectives, we performed bioinformatic predictions of CpG islands and corroborated *Lonp1* gene methylation changes by MSP-PCR; we assessed the binding of *Mecp2* to the *Lonp1* gene promoter by ChIP-*Mecp2*, measured the protein and phosphorylation levels of *Mecp2* (which regulate its binding/dissociation to the promoters of its target genes); determined *Lonp1* mRNA levels by RT-qPCR and *Lonp1* proteolytic activity by the FITC-Casein kit. In addition, we assessed Tau PHF-1 levels by Western blot; we performed ex-vivo treatments inhibiting *Lonp1* proteolytic activity to determine whether this promotes Tau PHF-1 accumulation and whether this accumulation induces mitochondrial dysfunction; finally, we performed *in vitro* degradation assays to assess whether Tau PHF-1 is a substrate of *Lonp1*. The results indicate that *Lonp1* promoter methylation increases in aging, that *Lonp1* is a target gene of *Mecp2*, and that in aging there is less binding of *Mecp2* to the *Lonp1* promoter, possibly as a consequence of the reduced levels of *Mecp2* and its phosphorylation at Serine 80, which would reduce the binding of *Mecp2* to its target genes. On the other hand, *Lonp1* mRNA levels are increased in the aged hippocampus, suggesting that *Mecp2* may act as a transcriptional repressor of *Lonp1*; but, surprisingly, *Lonp1* protein levels are reduced, as is its proteolytic activity, so that despite *Mecp2*-induced transcriptional regulation, there are probably other, as yet unknown, post-translational and degradation mechanisms that control *Lonp1* protein expression and its degradative activity in aging. Finally, *Lonp1* inhibition promotes Tau PHF-1 accumulation since Tau PHF-1 is a substrate of *Lonp1*, and Tau PHF-1 accumulation induces mitochondrial dysfunction. Thus, we conclude that *Mecp2* transcriptionally regulates *Lonp1*, that loss of *Lonp1* function induces Tau PHF-1 accumulation, and consequently, this induces mitochondrial dysfunction in the hippocampus of aged SAMP8 mice.

3. Introducción

3.1 Planteamiento del problema

El envejecimiento es un proceso fisiológico, donde diversos órganos, incluido el cerebro, se deterioran debido a cambios celulares y moleculares. Entre estos cambios encontramos las modificaciones epigenéticas, la disfunción mitocondrial y la pérdida de proteostasis que ocasiona la acumulación de proteínas anómalas. Interesantemente, en el último tiempo se ha propuesto una relación entre estos tres eventos, ya que cambios epigenéticos pueden regular la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales, modulando así la función mitocondrial. Por otra parte, nuevas funciones de la mitocondria incluyen la asistencia en la degradación de proteínas anómalas que se acumulan en el citoplasma, cuando los mecanismos de degradación cruciales, como el proteasoma, están reducidos en su función. En este contexto, Mecp2 es un regulador epigenético clave, ya que se expresa mayoritariamente en el cerebro y su expresión se reduce en el envejecimiento. Además, Mecp2 regula la expresión de proteasas mitocondriales como Clpx. En este trabajo de tesis, es de particular interés la proteasa mitocondrial Lonp1, ya que degrada más del 50% del proteoma mitocondrial, manteniendo la homeostasis y funcionalidad de la mitocondria. El gen *Lonp1* se localiza en el ADN nuclear, y en ciertas patologías o condiciones ambientales específicas cambia su patrón de metilación del ADN, lo que podría regular su expresión. Además, *Lonp1* presenta una cercanía genómica y funcional con la proteasa mitocondrial Clpx. Por lo tanto, es interesante estudiar la contribución de Mecp2 en la regulación de la expresión de *Lonp1* en el envejecimiento y si esto tiene un impacto en la acumulación de proteínas anómalas al interior de la mitocondria, ya que la ruta de asistencia a la degradación de proteínas citoplasmáticas requiere de la actividad proteolítica de Lonp1. La proteína Tau es sustrato del proteasoma, se localiza en el citoplasma y su función es regulada por las fosforilaciones; pero cuando es fosforilada en los residuos de serina 396 y 404 (epítope PHF-1) se acumula en mitocondrias del hipocampo de animales envejecidos, por razones desconocidas. Además, la sobreexpresión de Tau pseudofosforilada PHF-1 induce disfunción mitocondrial en cultivos primarios de neuronas corticales maduras, pero se desconoce si esto ocurre como un efecto

directo en la mitocondria o de manera indirecta. Por lo tanto, en esta tesis doctoral estudiamos si las metilaciones del ADN en el promotor de *Lonp1*, a través de *Mecp2*, inducen cambios en la expresión de esta proteasa en el envejecimiento. Asimismo, evaluamos si la actividad proteolítica de *Lonp1* se reduce durante el envejecimiento, induciendo la acumulación de proteínas anómalas en las mitocondrias del hipocampo de animales envejecidos, con especial foco en Tau PHF-1. Finalmente, evaluamos si Tau PHF-1 es un sustrato de degradación mitocondrial de *Lonp1* y si la pérdida de actividad proteolítica de *Lonp1* en el envejecimiento podría explicar la acumulación de Tau PHF-1 en la mitocondria, además de las consecuencias que esta acumulación ocasiona sobre la función mitocondrial.

3.2 Estado del arte

3.2.1 Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso biológico complejo y heterogéneo, caracterizado por la acumulación progresiva de daño a nivel celular, en tejidos y órganos, lo que provoca una mayor vulnerabilidad a la muerte del individuo (Lopez-Otin et al., 2023; Stauch et al., 2014). La esperanza de vida se ha incrementado en las últimas décadas. Para el año 2050 una de cada seis personas en el mundo tendrá más de 65 años, frente a una de cada 11 en el año 2019. Además, se estima que las personas mayores de 65 años se dupliquen, hasta alcanzar 1.500 millones de personas para el año 2050 (Extraído desde world population ageing, 2019), por lo que entender los procesos celulares y moleculares que subyacen al envejecimiento son de gran importancia. En el envejecimiento normalmente se observa un deterioro cognitivo, afectando el razonamiento, la memoria, la velocidad de procesamiento, la codificación de nueva información, entre otras (Wisdom et al., 2012). El hipocampo es una estructura del lóbulo temporal medial del cerebro, encargada de llevar a cabo los procesos de aprendizaje y memoria espacial y de reconocimiento (Strange et al., 2014). Sin embargo, su función disminuye progresivamente con la edad (Lemaitre et al., 2012).

Se han descrito 12 características distintivas en el envejecimiento, y cada una de ellas cumple con 3 criterios: (1) se manifiesta en el proceso de

envejecimiento, (2) su agravación experimental acelera el envejecimiento y, (3) su mejoramiento experimental retrasa el proceso de envejecimiento normal, y podría aumentar la esperanza de vida (Lopez-Otin et al., 2023; Stauch et al., 2014). En esta investigación queremos abordar 3 de estas características distintivas: i) Los cambios epigenéticos, que corresponden a modificaciones químicas del ADN sin modificar la secuencia de nucleótidos, por la adición de un grupo metilo en la citosina de dinucleótidos CpG, inducida por señales ambientales que regulan la expresión de los genes (Torres & Kerr, 2021); (2) la disfunción mitocondrial, debido a la deficiencia de los mecanismos de control de calidad mitocondrial y el daño oxidativo, lo que causa una acumulación de mitocondrias dañadas (Lores-Arnaiz et al., 2016) y (3) la pérdida de proteostasis que se debe, en parte, a la reducida actividad de los sistemas de degradación en la célula como el proteasoma, produciendo la acumulación de proteínas anómalas en el citoplasma (Lasagna-Reeves et al., 2011).

En el envejecimiento, la metilación del ADN muestra cambios en su localización dentro de la estructura del gen. Se ha reportado una disminución en la metilación en cuerpos génicos, regiones intergénicas y aumento de la metilación en las regiones promotoras de los genes en individuos envejecidos, debido a la disminución en la expresión de los escritores del epigenoma, las ADN metiltransferasas (DNMTs) (Xiao et al., 2019). Las DNMTs incorporan covalentemente un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina (5^{me}C) (Jung & Pfeifer, 2015). Se han descrito 2 clases de DNMTs: (1) DNMT1 de mantenimiento, que mantiene la metilación del ADN después de la replicación (Bestor, 2000), y se ha descrito una disminución en la expresión y actividad de estas DNMT1 en el tiempo (Casillas et al., 2003); y (2) DNMT 3a y DNMT3b que son los principales isotipos en la incorporación de un grupo metilo *de novo* (5^{me}C), y cuyos niveles disminuyen en el hipocampo de ratones C57BL6 de 18 meses (Oliveira et al., 2012). Estos cambios en la metilación en regiones promotoras del ADN en el envejecimiento conducen a cambios en la expresión génica, ya que la metilación impide la interacción entre las regiones reguladoras de los genes y los factores de

transcripción, silenciando así la expresión de los genes en la mayoría de los estudios realizados (Torres et al., 2019).

Las mitocondrias son organelos celulares que cumplen funciones en la producción de energía, el balance oxidativo y la homeostasis celular de calcio (Ly & Verstreken, 2006). En el envejecimiento, las mitocondrias son blanco de alteraciones estructurales y funcionales producto de la deficiencia de los mecanismos de control de calidad mitocondrial y el daño oxidativo, lo que se manifiesta por una acumulación de mitocondrias dañadas (Lores-Arnaiz et al., 2016); lo cual finalmente contribuye a la pérdida de memoria observada avanzada la edad. Las mitocondrias del hipocampo de ratones envejecidos (20 meses) son disfuncionales, debido a: (1) Disminución en la producción de ATP; (2) Incremento en la producción de ROS; (3) Daño oxidativo en las proteínas mitocondriales y (4) Pérdida de ultraestructura, evidenciado por la reducción en la electrodensidad de las mitocondrias por microscopía electrónica, lo que sugiere una menor densidad de la cadena transportadora de electrones y una menor función bioenergética (Torres et al., 2023).

Por otra parte, la red de proteostasis es un proceso coordinado para mantener un recambio de proteínas óptimas en la célula y así evitar la acumulación de proteínas dañadas, manteniendo la homeostasis del proteoma celular (Hipp et al., 2019). En cerebro envejecido se caracteriza por la acumulación de proteínas anormales como resultado de múltiples factores, dentro de ellos la deficiencia de las rutas degradativa de proteínas, y modificaciones post-traduccionales que favorecen que las proteínas pierdan su estructura nativa y función. Entre los mecanismos de degradación en la célula se encuentra i) el sistema ubiquitina proteasoma, principal sistema de control de calidad de proteínas en las células eucariontes, y responsable del 80-90% de la degradación de proteínas de manera dependiente de ATP (Coux et al., 1996); y ii) la vía autofagia-lisosoma, proceso de degradación de proteínas celulares mediante la fusión del autofagosoma con el lisosoma, responsable del 10-20% de la degradación de proteínas citoplasmáticas (Powers et al., 2009). En el envejecimiento estos mecanismos se encuentran deficientes, provocando la

acumulación de proteínas anómalas y en algunos casos la agregación de estas, dañando la función de organelos, entre ellos la mitocondria, y generando finalmente citotoxicidad (Lopez-Otin et al., 2023; Wyss-Coray, 2016).

Interesantemente, estos tres procesos se relacionan entre sí, ya que las modificaciones epigenéticas, y sus lectores epigenéticos incluyendo a Mecp2, regulan también la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales, pudiendo regular así la función mitocondrial y previniendo la pérdida de proteostasis mitocondrial. Sin embargo, en el envejecimiento esta conexión ha sido poco estudiada.

3.2.2 Lector y regulación transcripcional mediada por Mecp2

La proteína 2 de unión a metil CpG (Mecp2), codificada por el gen *Mecp2* que se localiza en el cromosoma X (X A7.3; X 37.63 cM), pertenece a la familia de proteínas de unión al ADN metilado (MBP), y es la proteína más expresada de esta familia en el cerebro (Tillotson & Bird, 2020; Torres et al., 2019). La proteína Mecp2 posee 3 dominios: i) el dominio MBD, que presenta la función de unirse a dinucleótidos CpG metilados (Free et al., 2001); ii) el dominio de represión transcripcional (TRD), cuya función es reclutar complejos represores y proteínas histonas desacetilasas (HDACs) (Bienvenu & Chelly, 2006); y iii) el dominio C-terminal, que facilita la interacción de Mecp2 con los nucleosomas y el ADN desnudo (Chandler et al., 1999). Mecp2 es un lector de cambios epigenéticos; específicamente puede unirse a metilaciones (5mC) e hidroximetilaciones (5hmC), pero con preferencia a la 5hmC (Tillotson & Bird, 2020). Las modificaciones del ADN mediante las 5mC y 5hmC, también ocurren en el ARN y reclutan proteínas de regulación del splicing en sitios específicos del ARN mensajero (mARN). Estudios de secuenciación del mARN en hipocampo y secuenciación de inmunoprecipitación de la cromatina contra Mecp2 en neuronas corticales de ratón han reportado que la proteína Mecp2 actúa como una proteína puente, al leer las modificaciones epigenéticas y guiar complejos de proteínas que regulan la expresión de sus genes blanco y splicing del mARN (Cheng et al., 2017). El lector epigenético Mecp2 presenta una expresión espacio temporal en el transcurso de la vida. La expresión

de Mecp2 es alta durante el desarrollo embrionario y posnatal, estimándose alta a los 10 años en humanos y 5-10 semanas en ratón (Shahbazian & Zoghbi, 2002). En cerebros completos de ratones C57BL/6, la expresión de Mecp2 aumenta desde los 24 meses y disminuye entre los 31 y 32 meses de edad (Langie et al., 2017). A nivel de proteínas, Mecp2 ha sido estudiada, desempeñando una función como regulador de la expresión génica en el desarrollo neuronal y crecimiento de nuevas neuronas (Chen et al., 2003; Tao et al., 2009). En estudios de pérdida de función de Mecp2, como las mutaciones Mecp2, se ha identificado que es la principal causa del síndrome de Rett, un trastorno progresivo del neurodesarrollo que afecta casi exclusivamente a niñas (Tai et al., 2016). Interesantemente, todos estos estudios sugieren que la función del factor de transcripción Mecp2 en el hipocampo envejecido no ha sido totalmente explorada.

La función de Mecp2 está regulada por modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación y sumoilación. La fosforilación en serina 421 de Mecp2 fue el primer sitio identificado; esta fosforilación es dependiente de CaMKII inducida por activación neuronal, lo que promueve la disociación de Mecp2 del promotor de BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro), facilitando así la transcripción de este factor (Zhou et al., 2006). La siguiente modificación post-traduccional que regula la función de Mecp2 es la fosforilación en la serina 80. Esta fosforilación regula la unión de Mecp2 a los promotores de sus genes blanco. Es importante destacar que esta fosforilación ocurre de manera inversa a la fosforilación en serina 421, y es regulada negativamente por la activación neuronal (Tao et al., 2009). Por último, la sumoilación en lisina 412 por PIAS1 (E3 ligasa) que es facilitada por las fosforilaciones en treonina 308 o serina 421, lo cual aumenta la unión de Mecp2 al ADN metilado, disociando la unión del complejo represor Sin3A y HDAC1 de Mecp2, lo cual favorece el aumento de la expresión de BDNF (Tai et al., 2016). Por lo tanto, es primordial evaluar la expresión y las modificaciones post-traduccionales como las fosforilaciones que regulen su función en el proceso del envejecimiento.

3.2.3 Genes mitocondriales codificados en el núcleo y regulados por Mecp2

Uno de los primeros antecedentes de que Mecp2 regula la expresión de genes mitocondriales codificados por el ADN nuclear se generó en pacientes con síndrome de Rett, donde se observaron cambios en la expresión de casi 500 genes nucleares debido a la disfunción del lector epigenético Mecp2; y en particular se identificó un aumento en la expresión de genes mitocondriales directamente relacionados en la producción de energía, estructura y ribosomas de este organelo (Pecorelli et al., 2013). Sumado a este antecedente, un estudio de secuenciación profunda de RNA del hipocampo de ratas WT y knockdown de Mecp2 encontró cambios en la expresión de proteasas mitocondriales, incluyendo la serina proteasa HtrA2 y la proteasa dependiente de ATP Clpx (Cheng et al., 2017). Estos antecedentes sugieren una función de Mecp2 en la regulación de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales, y de ellos destaca su regulación sobre la proteasa mitocondrial Clpx, ya que es una proteasa soluble y localizada en la matriz mitocondrial, sugiriendo que otras proteasas mitocondriales que comparten características con Clpx pueden también ser blanco de regulación por Mecp2 como Lonp1. Clpx y Lonp1 cooperan y atenúan el estrés proteotóxico en la mitocondria. Adicionalmente, los genes de Lonp1 y Clpx poseen una localización cercana en el cromosoma 19 en humano y cromosoma 17 en ratón (Lee et al., 2021). En base a estos antecedentes, en este trabajo de tesis nos preguntamos si el gen *Lonp1* puede ser un blanco de regulación por Mecp2, y si la regulación transcripcional puede cambiar durante el proceso de envejecimiento.

3.2.4 Regulación epigenética y transcripcional de Lonp1

La proteasa mitocondrial Lonp1 es codificada por el gen nuclear *Lonp1* localizado en el cromosoma 17 en *Mus musculus*. En células humanas el gen *LONP1* está localizado en el cromosoma 19 (19p13.3), el cual posee 22 exones codificantes, y se expresan 3 isoformas (Gibellini et al., 2020; Pinti et al., 2016). La variante 1 no es blanco de empalme alternativo y contiene la secuencia MTS (por sus siglas en inglés, Mitochondrial-Targeting Sequence), formando una proteína de 959 aa. La variante 2 y 3 son producto del corte y empalme alternativo del exón 1, generando la isoforma 2 de LONP1 de 895 aa, que carece de los aminoácidos 42-

105 en el extremo N-terminal, y la variante 3 no tiene el exón 1, y genera la isoforma 3 de Lonp1 de 763 aa, no presenta los aminoácidos 1-196 en el extremo N-terminal (Gibellini et al., 2020). La localización de la isoforma 1 y 2 es en núcleo, citoplasma y mitocondria; la isoforma 3 se distribuye en núcleo y citoplasma. Las 3 isoformas de Lonp1 se localizan en el núcleo en condiciones de estrés térmico en células humanas (Gibellini et al., 2022; Gibellini et al., 2020; Zanini et al., 2022), presumiblemente para modular la respuesta a estrés. Sin embargo, a la fecha no se han estudiado las 3 isoformas de Lonp1 en modelos murinos.

Por otra parte, la regulación transcripcional del gen *LONP1* es poco conocida. Se han identificado tres sitios de unión para el factor de transcripción NRF-2 en células humanas (por sus siglas en inglés, Nuclear Respiratory Factor-2) en la región promotora del gen *LONP1* (Bahat et al., 2015; Pinti et al., 2011). Además, estudios han demostrado que sirtuina 1, una desacetilasa dependiente de NAD⁺ promueve la expresión de Lonp1 mediante la vía de señalización Sirtuina 1-PGC1-a (por sus siglas en inglés, peroxisome proliferator-activated receptor coactivator)-NRF-2 frente a una condición de disfunción mitocondrial inducida por alta glucosa en células PC12 (Kalvala et al., 2020). Sin embargo, es altamente probable que existan otras formas de regular la expresión de Lonp1 que no han sido estudiadas. En el cerebro, la regulación de la expresión de genes subyace a los procesos asociados a eventos de plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria (Telese et al., 2015). Las modificaciones químicas del ADN, mediante la adición covalente de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina ocurren con mayor frecuencia en el dinucleótido CpG, que es una marca epigenética inducida por distintas señales ambientales que modifican la expresión de genes sin alterar la secuencia del ADN (Torres et al., 2019). Estos cambios epigenéticos regulan la expresión génica durante el proceso de envejecimiento (Ianov et al., 2017; Torres et al., 2019). Estudios llevados a cabo mediante análisis de metilación de islas CpG del gen *LONP1* han mostrado un cambio de metilación en un dinucleótido CpG (posición 5709149 del ADN genómico; río arriba del sitio de inicio de la transcripción), en personas expuestas a contaminación ambiental por dióxido de nitrógeno (Gruzieva et al., 2017). Además, en pacientes con encefalomielitis miálgica/síndrome de fatiga

crónica (EM/SFC) se identificó una hipometilación en la región reguladora (enhancer; GH19J005798) de *LONP1*, sugiriendo que la hipometilación en la región reguladora podría aumentar la expresión de *LONP1* en un estado de estrés agudo en pacientes EM/SFC (Helliwell et al., 2020). Por lo tanto, esta evidencia apoya la idea de que el gen *LONP1* podría ser blanco de modificaciones epigenéticas que pueden regular su expresión por proteínas de unión al ADN metilado, como Mecp2, bajo diversas condiciones de estrés. Bajo este escenario, se desconoce si se producen cambios en la metilación del promotor de *LONP1* que puedan dar cuenta de cambios en sus niveles de expresión asociados al envejecimiento.

3.2.5 Proteasa mitocondrial Lonp1

La mitocondria posee sus propias chaperonas y proteasas. Las proteasas mitocondriales pertenecen a la superfamilia AAA+ (ATPasas Asociadas a diversas Actividades celulares), las cuales ejercen su función dependiente de ATP y están encargadas de mantener la homeostasis de la mitocondria (Campello et al., 2014; Glynn, 2017). Estas proteasas procesan proteínas importadas a la mitocondria eliminando sus señales de importación mitocondrial, y están encargadas del control de calidad del proteoma mitocondrial mediante la degradación de proteínas mal plegadas y dañadas en la mitocondria. Además, participan en el tráfico, procesamiento y activación de proteínas; biogénesis mitocondrial; respuestas al estrés; dinámica mitocondrial; mitofagia y apoptosis (Campello et al., 2014; Opalinska & Janska, 2018). Lonp1 es una proteasa mitocondrial que se sintetiza en ribosomas libres en el citoplasma, generando una proteína precursora que contiene en su extremo amino-terminal una secuencia de direccionamiento a la mitocondria (MTS) (Pinti et al., 2015; Zurita Rendon & Shoubridge, 2018). En la mitocondria, la secuencia MTS es clivada por las peptidasas mitocondriales y se ensambla el homohexamero funcional de Lonp1 en la matriz mitocondrial (Gibellini et al., 2020). Se presume que LONP1 presenta una tasa de vida media promedio de 6 horas en células humanas, de acuerdo con lo observado en tratamientos con cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) en células SW480, donde los niveles proteicos de LONP1 disminuyen a partir de las 6 horas de tratamiento; siendo el lisosoma el principal mecanismo de degradación en células humanas (Wu et al., 2023).

Lonp1 es responsable de degradar más del 50% de las proteínas de la mitocondria y de mantener el control de calidad del proteoma mitocondrial (Zurita Rendon & Shoubridge, 2018). Es una serina peptidasa de 959 aa, compuesta de tres dominios: i) el dominio amino terminal (67-485 aa), que presenta funciones de reconocimiento y selección del sustrato; ii) el dominio AAA (486-729 aa), cuya función es desplegar el sustrato dependiente de ATP; y iii) el dominio P (Proteolítico; 730-959 aa), que degrada sustratos a través de los aminoácidos catalíticos de serina (855) y lisina (890). Lonp1 se expresa de manera ubicua, presentando diferencias en su expresión dependiendo del tipo celular, siendo su expresión más alta en tejidos con alta demanda energética como el músculo esquelético (De Gaetano et al., 2020). En su estructura presenta un dominio ATPasa entre los aminoácidos 486 y 729, cuya función es desplegar y traslocar los sustratos hacia el dominio proteolítico, actividad dependiente de ATP. A nivel estructural la LONP1 humana, los aminoácidos; ácido glutámico posición 591, tirosina en las posiciones 565 y 599 son importantes en la translocación y degradación de los sustratos, cuya acción depende de ATP.

La fosforilación es la principal modificación post-traduccional que regula la actividad proteolítica de Lonp1 (Shin et al., 2021), la fosforilación en Serina 173 y Serina 181 mediada por la quinasa Akt en la mitocondria aumentan la actividad de esta proteasa (Ghosh et al., 2019). Asimismo, la acetilación de Lonp1 aumenta su estabilidad y promueve una mayor función mitocondrial (Wu et al., 2023). Por otra parte, la oxidación (carbonilación y nitración) y la desacetilación (Gibellini et al., 2014) disminuyen la actividad de Lonp1 y contribuyen a la pérdida de la función bioenergética de la mitocondria (Hoshino et al., 2014). Sirtuina 3 desacetila a Lonp1 en la Lisina 145, promoviendo su ubiquitinación (Lisina 63) y su posterior degradación por el lisosoma (Wu et al., 2023). La función de Lonp1 además es modulada por distintas condiciones de estrés, como hipoxia y estrés oxidativo, entre otras (Pinti et al., 2016). Así, Lonp1 regula la función de la mitocondria, a través de: i) su actividad proteolítica, degradando proteínas modificadas, oxidadas y mal plegadas (He et al., 2018; Ruan et al., 2017); ii) su actividad chaperona, contribuye al ensamblaje de los complejos de la cadena transportadora de electrones (Rep et

al., 1996) y iii) su capacidad de unión y mantención del ADN mitocondrial (Fu & Markovitz, 1998; Yang et al., 2022) y regulación de la expresión de genes codificados por el ADN mitocondrial, a través de la regulación de los niveles del factor A de transcripción mitocondrial (TFAM) (Lu et al., 2013).

Interesantemente, diversas proteasas mitocondriales tienen la capacidad de degradar proteínas citosólicas. Por ejemplo, la proteasa de matriz mitocondrial PreP (peptidasa de presecuencia) degrada al péptido β -amiloide ($A\beta$ 1-40; $A\beta$ 1-42) (Falkevall et al., 2006) y la proteasa del espacio intermembrana mitocondrial HtrA2 (proteasa A2 requerida-alta-temperatura) degrada *in vitro* a la proteína precursora del amiloide (APP) (que es sustrato de degradación proteasomal) (Huttunen et al., 2007). Así, las proteasas mitocondriales podrían contribuir en la degradación de proteínas citosólicas, previniendo la acumulación de proteínas anómalas. Esta capacidad degradativa de la mitocondria se ha propuesto como una ruta complementaria y de asistencia a la degradación, por el incremento de proteínas mal plegadas en el citoplasma (Li et al., 2019). En esta ruta de degradación mitocondrial se ha descrito la participación de 3 proteínas: Hsc70, chaperona citosólica que dirige cargos hacia la mitocondria (Kaushik & Cuervo, 2015); FUNDC1, proteína localizada en la membrana externa mitocondrial (Liu et al., 2012) y Lonp1 con actividad proteolítica para degradar estas proteínas (Ruan et al., 2017; Zurita Rendon & Shoubridge, 2018). Se ha reportado que proteínas citoplasmáticas, sustratos de degradación proteasomal, como β -catenina (de 781 aa) y p53 son importadas a la mitocondria a través de su interacción con HSC70/FUNDC-1 y luego degradadas por Lonp1, cuando el proteasoma se encuentra inhibido (Li et al., 2019).

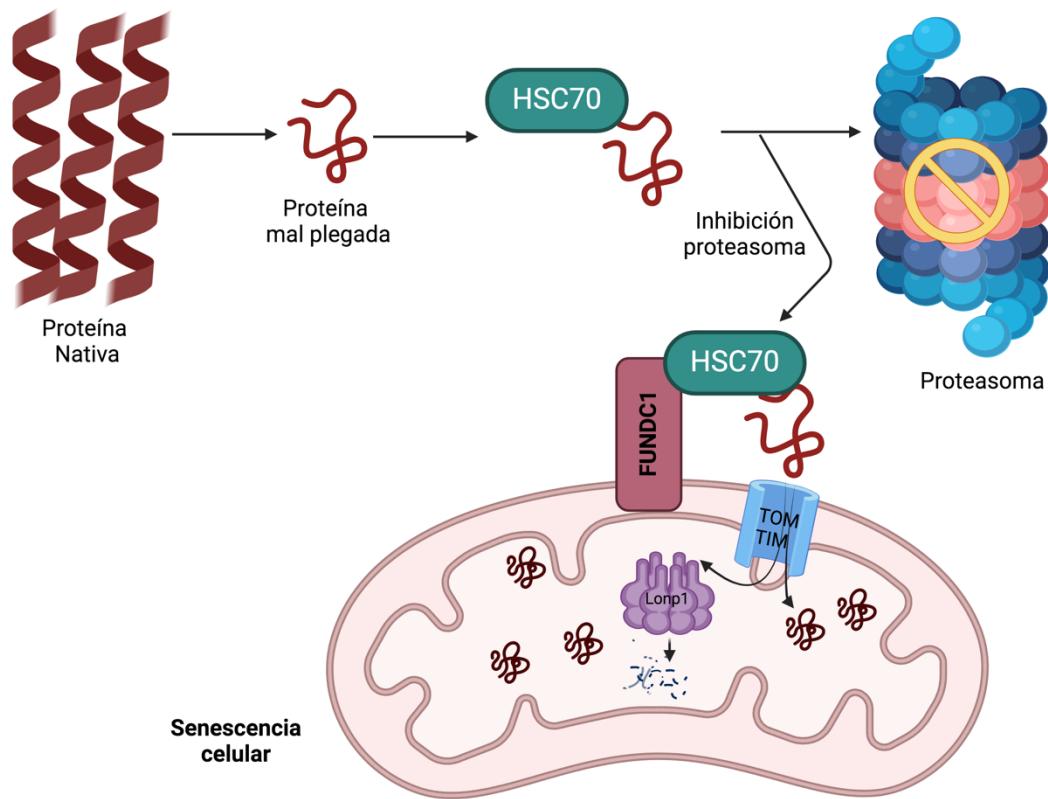


Figura 1: Representación de la ruta de asistencia a la degradación de proteínas citoplasmáticas por la mitocondria. Estudio de inhibición del proteasoma en células HeLa muestran la ruta de degradación mitocondrial propuesta para proteínas citoplasmáticas: Chaperona Hsc70-FUNDC1 (receptor de mitofagia de membrana externa mitocondrial)-Complejo TOM/TIM- Proteasa LONP1, cuando el proteasoma se encuentra inhibido. Modificado de Li y colaboradores (Li et al., 2019). Ilustración realizada en Biorender.

De igual manera, TDP-43 (Del inglés, TAR DNA-binding protein 43), proteína de 414 aa que en su forma patológica (demencia frontotemporal) causa daño mitocondrial, es importada a la mitocondria y degradada por Lonp1 (Wang et al., 2019). Por lo tanto, Lonp1 desempeña un papel fundamental en el control de calidad del proteoma mitocondrial y asiste a la célula en la degradación de proteínas citosólicas, para contrarrestar su acumulación, cuando la función del proteasoma es deficiente.

Estudios realizados en el hipocampo de ratas envejecidas muestran una disminución de la actividad proteolítica del proteasoma con la edad, lo cual aumenta los niveles de proteínas ubiquitinadas, mal plegadas, agregadas y oxidadas (Keller et al., 2000). Resultados similares hemos obtenidos en nuestro laboratorio en ratones modelo de envejecimiento acelerado SAMP8 (datos no publicados); lo que sugiere que en el hipocampo envejecido otras proteínas podrían estar siendo direccionadas a la mitocondria para ser blanco de degradación mitocondrial, incluyendo la proteína Tau fosforilada.

3.2.6 Proteína Tau

La proteína Tau se expresa mayoritariamente en neuronas y su principal función es la organización, polimerización y estabilización de los microtúbulos (Tapia-Rojas, Cabezas-Opazo, et al., 2019; Weingarten et al., 1975). Tau es blanco de diversas modificaciones post-traduccionales como metilación, acetilación, ubiquitinación, entre otras (Avila et al., 2016; Guo et al., 2017), siendo la más común la fosforilación (Avila et al., 2004). Las fosforilaciones en Tau regulan su función en la estabilización y dinámica de microtúbulos, el crecimiento de neuritas y el transporte axonal (Johnson & Stoothoff, 2004). Sin embargo, un aumento de su fosforilación en residuos específicos la desestabiliza de los microtúbulos (Hanger et al., 2009) y promueve su acumulación; formando los agregados intracelulares característicos de un grupo de enfermedades degenerativas conocidas como Taupatías (Crespo-Biel et al., 2012). Interesantemente, además se ha observado la acumulación de Tau fosforilada en cerebros de individuos envejecidos en ausencia de enfermedades neurodegenerativas (Torres et al., 2021). Estudios han mostrado

que la fosforilación de Tau en los residuos de serina 396 y 404, epítope conocido como PHF-1 (Del inglés, Paired Helical Filaments), induce disfunción mitocondrial *in vitro*, en cultivos primarios de neuronas corticales maduras (14 DIV), afectando el potencial de membrana mitocondrial y aumentando el estrés oxidativo (Quintanilla et al., 2014). Asimismo, reportes han demostrado que formas anómalas de Tau inducen deterioro de la memoria hipocampal en roedores WT, por un mecanismo desconocido (Lasagna-Reeves et al., 2011). Resultados de nuestro laboratorio muestran que los niveles de Tau PHF-1 aumentan drásticamente en el hipocampo de ratones WT envejecidos (18 meses) en comparación con ratones adultos no seniles (3 meses) (Torres et al., 2021), aumento que se correlaciona con la aparición de la pérdida de memoria hipocampal (Olesen et al., 2020). Por el contrario, la delección de Tau mejora la función mitocondrial y las capacidades cognitivas en el hipocampo de ratones KO Tau de 3 meses, y reduce el deterioro cognitivo y mitocondrial durante el envejecimiento (Jara et al., 2018). Por lo tanto, esto sugiere fuertemente que Tau PHF-1 podría jugar un papel clave en la disfunción mitocondrial del hipocampo a avanzada edad.

Tau ejerce su función en el citoplasma y presenta dos vías principales de degradación, el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía autofagia-lisosoma, los cuales contribuyen a su tasa de recambio (Vaz-Silva et al., 2018). Sin embargo, durante el envejecimiento ambos mecanismos de degradación muestran reducida capacidad de proteólisis (Korovila et al., 2017), lo que favorece la acumulación de la proteína Tau y sus formas modificadas. Sorpresivamente, resultados de nuestro laboratorio muestran que la proteína Tau PHF-1 se acumula en el interior de las mitocondrias del hipocampo de ratones WT envejecidos (18 meses) en comparación con ratones de 3 meses (Torres et al., 2021). No obstante, se desconocen las razones por las cuales la proteína Tau, que ejerce su función en el citoplasma, se encuentra en altos niveles al interior de la mitocondria, sobre todo considerando que a la fecha no se ha descrito ninguna función de Tau asociada a este organelo. Dado que se ha propuesto que la mitocondria podría actuar como una ruta complementaria de degradación de proteínas citosólicas cuando el proteasoma se encuentra inhibido (Li et al., 2019), **¿será Tau PHF-1 dirigida a la mitocondria para**

su degradación? Tau PHF-1 interactúa con la chaperona HSC70 en el citoplasma, interacción que regula los niveles proteicos de Tau y su estabilidad con los microtúbulos en taupatías (Fontaine et al., 2015). Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que en el hipocampo Tau PHF-1 interactúa con las tres proteínas claves de la ruta de degradación mitocondrial HSC70, FUNDC1 y Lonp1, interacción que aumenta en el envejecimiento; sugiriendo fuertemente que Tau PHF-1 es sustrato de degradación mitocondrial. Además, al inhibir la actividad del proteasoma en el hipocampo de ratones de 3 meses observamos la aparición de bandas de menor peso molecular en ensayos de Western Blot y un aumento drástico en los niveles de Tau PHF-1 en la mitocondria, sugiriendo que en un escenario con actividad proteasomal reducida, similar a lo observado en el envejecimiento, Tau PHF-1 se importa a la mitocondria y posiblemente se degrada (manuscrito en preparación). Sin embargo, en base a lo descrito hasta la fecha, no hay estudios que describan que Tau PHF-1 es degradada en la mitocondria por la proteasa Lonp1 y si esta degradación se ve afectada por los cambios que Lonp1 pudiera experimentar durante el envejecimiento.

En resumen, de los antecedentes presentados indican que:

1. Aumenta la metilación de genes en el envejecimiento.
2. Mecp2 regula genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales y así modula su expresión, pero Mecp2 disminuye en el envejecimiento.
3. Lonp1 cambia su patrón de metilación del ADN en regiones reguladoras en pacientes expuestos a contaminación ambiental y enfermedades crónicas.
En envejecimiento aún no se ha determinado.
4. Lonp1 en tejidos periféricos disminuye su expresión y actividad
5. Lonp1 es una proteasa mitocondrial que degrada sustratos del proteasoma importados a la mitocondria cuando el proteasoma es deficiente.
6. La proteína Tau PHF-1 se acumula en el envejecimiento en la mitocondria, por razones desconocidas.
7. La sobreexpresión de Tau pseudofosforilada en serina 396 y 404 induce disfunción mitocondrial por un mecanismo desconocido y en ratones knockout de Tau, aumenta la función mitocondrial.

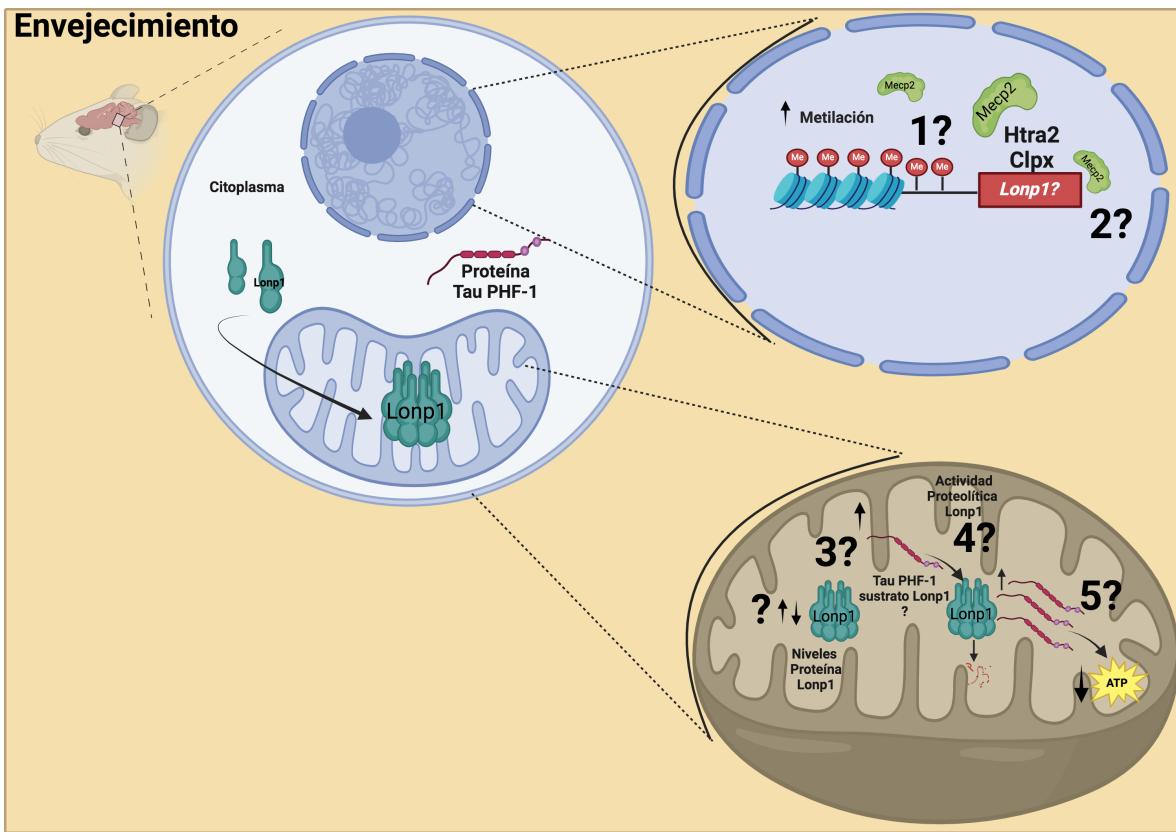


Figura 2: Hipótesis gráfica de la tesis doctoral. En base a los antecedentes presentados proponemos que, en el envejecimiento: 1) *Lonp1* presenta cambios en su patrón de metilación, lo que modifica su regulación epigenética y por ende su expresión, y 2) que esto sería mediado por el lector epigenético *Mecp2*, 3) ocasionando un cambio en los niveles de expresión de *Lonp1*. Además, proponemos que, 4) cambios en la actividad proteolítica de *Lonp1* promueven la acumulación de *Tau PHF-1* en la mitocondria, ya que esta proteína anormal es un nuevo sustrato de degradación de *Lonp1*; y que 5) la acumulación de tau PHF-1 en la mitocondria finalmente induce disfunción mitocondrial.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos proponemos la siguiente hipótesis:

4.1 Hipótesis:

“Cambios en el control transcripcional de Lonp1 mediados por Mecp2 y en la actividad de esta proteasa en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos contribuyen a la disfunción mitocondrial inducida por la acumulación de Tau PHF-1 en este organelo”.

4.2 Objetivo general:

“Evaluar la regulación epigenética mediada por Mecp2 y la función de Lonp1, en su capacidad proteolítica de Tau PHF-1, en mitocondrias hipocampales de un modelo murino del envejecimiento”.

4.3 Objetivos específicos:

- I) Evaluar cambios en el control transcripcional de *Lonp1* mediados por *Mecp2* y en su actividad proteolítica en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 adultos y envejecidos.

- II) Determinar la disminución de la actividad proteolítica de *Lonp1* aumenta los niveles de *Tau PHF-1* en la mitocondria, causando la disfunción mitocondrial en el hipocampo de ratones SAM no envejecidos.

5. Metodología, Materiales y Métodos

5.1 Soluciones y tampones:

Todas las soluciones y tampones fueron preparadas en base a los volúmenes a trabajar en cada uno de los procedimientos experimentales realizados en esta investigación.

Tabla 1: Soluciones y tampones de trabajo.

| Soluciones | Reactivos | pH |
|---|---|------|
| Tampón medio de aislamiento | 225 mM de sacarosa, 75 mM de manitol, 1 mM de EGTA, 5 mM de HEPES. | 7,40 |
| Tampón MSH | 230 mM de manitol; 70 mM de sacarosa; 5 mM de Hepes y suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas. | 7,40 |
| Tampón de respiración | 125 mM KCl; 0,1% BSA; 20 mM HEPES; 2 mM MgCl ₂ ; 2,5 mM KH ₂ PO ₄ . | 7,40 |
| Tampón de inmunoprecipitación | Tampón HEPES; NaCl 0,5 M; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM, NP-40 1% y NaF 25 mM, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas | 7,40 |
| Tampón actividad de Lonp1 | 50 mM Tris-HCl; 100 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 0,01% BSA; 0,005% Triton; 1 mM DTT | 8,0 |
| Solución de corte en frío | 126 mM NaCl; 75 mM sacarosa; 3 mM KCl; 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ ; 25 mM NaHCO ₃ ; 10 mM Dextrosa; 3,5 mM MgSO ₄ ; 0,5 mM CaCl ₂ ; 3 mM Piruvato; 0,5 mM L-ascorbato; 305 mOsm. | 7,40 |
| Solución líquido cefalorraquídeo artificial | 126 mM NaCl; 3,5 mM KCl; 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ ; 25 mM NaHCO ₃ ; 10 mM Dextrosa; 1 mM MgSO ₄ ; 2 mM CaCl ₂ ; 3 mM Piruvato; 0,5 mM L-ascorbato; 3 mM Inositol. | 7,40 |

| | | |
|--------------|---|------|
| Tampón HEPES | 25 mM Hepes, 125 mM NaCl, 25 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, suplementado con una mezcla de inhibidores de la proteasa (Nº catálogo 78429, Thermo Fisher Scientific) e inhibidores de fosfatasa (NaF 25 mM, Na2P2O7 30 µM, Na3VO4 100 mM) | 7,40 |
| Tampón RIPA | 25 mM Tris–Cl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, and 0,1% SDS | 7,40 |

Piruvato (P2256, Sigma Aldrich), malato (M6413, Sigma Aldrich), kit de ensayo de proteínas BCA (23227, Thermo Fisher Scientific).

5.2 Anticuerpos:

Tabla 2: Listado de anticuerpos utilizados en este estudio.

| Anticuerpos | Especie | Dilución | Nº Catalogo | Empresa |
|------------------|---------|-------------|-------------|--------------------------|
| Anti-Caseína | Conejo | 1:1000 | PA5-119527 | Invitrogen |
| Anti-GAPDH | Conejo | 1:1000 | Sc-25778 | Santa cruz Biotechnology |
| Anti-HMGCS2 | Conejo | 1:1000 | A14244 | AB clonal |
| Anti-Lamina A | Conejo | 1:1000 | Sc-20680 | Santa cruz Biotechnology |
| Anti-Lonp1 | Conejo | 1:1000 | PA551692 | Termo Fisher Scientific |
| Anti-Lonp1 | Ratón | 1:1000 | Sc-293244 | Santa cruz Biotechnology |
| Anti-Mecp2 | Conejo | 1:1000 | 07-013 | Merck Millipore |
| Anti-Mecp2 | Conejo | 3 µg por IP | ab2828 | Abcam |
| Anti-Mecp2 Ser80 | Conejo | 1:1000 | AB_2793344 | Active Motif |
| Anti-Mecp2 | Conejo | 1:1000 | AB_254050 | Active Motif |

| | | | | |
|----------------|--------|--------|---------------------------|-----------------------------|
| Ser421 | | | | |
| Anti-tau PHF-1 | Ratón | 1:1000 | Donado Dr. Peter Davis | Donado Dr. Peter Davis |
| Anti-Tau | Conejo | 1:1000 | 2024-10-31 | Dako |
| Anti-TFAM | Ratón | 1:1000 | MA5-16148 | Invitrogen |
| Anti-VDAC | Conejo | 1:1000 | Sc-390996 | Santa cruz Biotechnology |

5.3 Modelo animal:

Los ratones utilizados en esta investigación fueron obtenidos desde ENVIGO y fueron reproducidos y mantenidos en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida. Los ratones SAM corresponden a la cepa AKR/J y son un modelo endogámico desarrollado en el laboratorio del Dr. Toshio Takeda de la Universidad de Tokio (Yagi et al., 1988). Los ratones SAMP8 (por sus siglas en inglés Senescence-Accelerated Mouse Prone 8) desarrollan senescencia a temprana edad. Los ratones SAMR1 son ratones de envejecimiento normal a pesar de la endogamia, por lo que se les considera resistentes a la senescencia (SAMR1, de sus siglas en inglés Senescence-Accelerated Mouse Resistant 1). Las comparaciones de nuestra colonia con la literatura se describen en la **Tabla 3**. La caracterización de nuestras colonias SAM se muestran en el anexo 1.

En esta tesis, sólo se utilizaron ratones hembras SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses de edad y el número de animales esta descrito en las leyendas de cada figura. Antes de realizar los experimentos, fueron trasladados hasta la sala de mantención del CEBICEM y mantenidos a temperatura ambiente promedio de 22-24°C, con ciclos diarios de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales de los ratones fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Universidad San Sebastián. La formulación de ética fue aprobada por el comité ético científico de la Universidad San Sebastián, código interno CEC N° 23-2021-20.

Comparación de ratones SAMR1 y SAMP8 en tejido hipocampal:

Tabla 3: Características reportadas en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8.

| | SAMR1 | SAMP8 |
|---|--|--|
| Deterioro Cognitivo evaluado por la prueba Morris Water Maze. | - No presenta alteraciones cognitivas hasta los 6 meses (Orejana et al., 2012). - No existen estudios a mayor edad. | - 7 meses, en nuestra colonia- 6 meses literatura (Orejana et al., 2012). |
| Deterioro Cognitivo evaluado por la prueba T-Maze task. | - No presenta alteraciones cognitivas hasta los 12 meses de edad (Miyamoto et al., 1986). - No existen estudios a mayor edad. | - 7 meses en nuestra colonia. - 8-10 meses literatura (Miyamoto et al., 1986). |
| Tau fosforilada: PHF-1 (Ser396/404) AT8 (Ser202/Thr205) | - Tau PHF-1 y AT8 sin cambios hasta los 9 meses de edad (Orejana et al., 2012). No existen estudios a mayor edad. | - Lo hemos detectado a los 6 meses en nuestra colonia. - Sólo se ha medido a los 9 meses en la literatura (Orejana et al., 2012). |
| Disfunción sinápticas | Sin reportes. | 7-8 meses (Akiguchi et al., 2017). |
| Daño oxidativo | Sin reportes. | 7-8 meses (Butterfield et al., 1997). |
| Disfunción mitocondrial | Sin reportes. | 7 meses (Eckert et al., 2013). |
| Tiempo vida | 22 meses, nuestro modelo 19-21 meses literatura (Flood & Morley, 1998). | 15 meses promedio en nuestra colonia 10-17 meses literatura (Butterfield et al., 1997). |

5.4 Extracción del hipocampo:

Para todos los procedimientos se utilizó anestésico al 2% de isoflurano mezclado con oxígeno en cámara de inducción de anestesia. Los ratones SAMP8 y SAMR1 de 2 y 7 meses de edad fueron eutanasiados por dislocación cervical y decapacitación posterior a la inducción de anestesia. El hipocampo completo fue obtenido e inmediatamente utilizado para los experimentos.

5.5 Identificación de islas CpG del promotor del gen *Lonp1*:

Para la predicción de islas CpG del gen *Lonp1*, se realizó una búsqueda de la secuencia de ADN genómico y la región promotora de *Lonp1*, se utilizó la base de datos National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), donde se definió la secuencia nucleotídica: 3000 pb antes del sitio de inicio de la transcripción y 1000 pb después del sitio de inicio de la transcripción (TSS del inglés, Transcription Start Site). La secuencia fue copiada en un archivo de salida formato FASTA. Luego, se utilizó la herramienta bioinformática Methprimer, The Li lab (www.urogene.org) para identificar si el promotor y parte del gen *Lonp1* posee islas CpG, y además a través de esta misma plataforma se generaron partidores para realizar un análisis para MSP (PCR específica para metilación). Para la identificación de zonas ricas en CpG se utilizaron los siguientes criterios: i) el tamaño de la región debe ser mayor a 100 pb; ii) el porcentaje GC debe ser mayor al 50% y iii) debe contener una razón CpG observado / esperado mayor al 60%, que se calcula por ((número de CpG/ número de C x número de G) x número total de nucleótidos en la secuencia) (Li & Dahiya, 2002).

Tabla 4: Secuencia de partidores para MSP-PCR.

| Gene | Forward primer | Reverse primer |
|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| <i>Lonp1</i> Methylation | 5'- GTAGGAATTGGGAGGGGTTACGT -3' | 5'- AATATATAATCCGAATAAAAAACGCT -3' |
| <i>Lonp1</i> Non- Methylation | 5' TTGTAGGAATTGGGAGGGGTTATGT 3' | 5' ATATATAATCCAATAAAAACACT 3' |

5.6 Modificación de ADN genómico por bisulfito de sodio:

Para evaluar los niveles de metilación del ADN en el promotor de *Lonp1*, se realizó la extracción de ADN genómico (ADNg) mediante el kit GeneJet Genomic (Thermo, Cat K0721), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ADNg obtenido fue cuantificado por nanodrop por absorción a 260 nm. La modificación por bisulfito de sodio se realizó a partir de 1 µg de ADNg utilizando el kit CP genome turbo bisulfite modification (Merck, cat S7847) siguiendo las instrucciones del fabricante. La modificación del ADNg se realizó mediante el

protocolo : 98°C por 10 min y 60°C por 150 min. El ADNg modificado se purificó por columnas de purificación y se eluyó en 16 µL de buffer de elución.

5.7 PCR de metilación específica:

Para la identificación de cambios de los niveles de metilación del ADN en el promotor de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses de edad, se utilizó la técnica de PCR específico de metilaciones (MSP-PCR), se utilizó el ADNg convertido como templado de la reacción, y los partidores generados en el programa bioinformático (Methprimer, The Li lab), y Sapphire Amp fast PCR máster mix (Takara, cat RR350B). Las islas CpG presentan un alto contenido CG, lo cual aumenta la formación de estructuras secundarias (estructura tipo-hairpin), por lo que se realizó un gradiente de temperatura y DMSO (1%-2,5%-5%). El PCR consta de una etapa inicial de denaturación 95°C. Luego se realizaron 40 ciclos determinadas experimentalmente por el PCR en gradiente de temperatura. Cada ciclo constó de 3 etapas: 1) Denaturación 95°C; 2) Alineamiento de los partidores al templado segundos 59°C y 3) extensión de la polimerasa en el templado 72°C. Finalizada la PCR, se visualizaron los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa al 2,5%. La razón de metilación se calculó comparando las densitometrías de los productos de MSP-PCR, con los partidores generados para identificar diferencias en los niveles de metilación en las islas CpG identificadas (Mirta Ríos, tesis de grado 2013, Laboratorio Dr. Bredford Kerr).

5.8 Expresión de genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real:

Para determinar los cambios en los niveles de transcritos de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses de edad, se utilizó la técnica de RT-qPCR. Para la extracción del ARN total desde el hipocampo completo, se diseccionaron los cerebros, y las muestras se homogenizaron en Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se precipitó y se trató con una unidad turbo DNase I (Invitrogen). 5 µg de ARN total se retro-transcribieron utilizando random primers, Oligo d(T)₁₈ y el kit de transcriptasa inversa Super-Script IV (Invitrogen). Para la expresión relativa del cDNA del gen *Lonp1* se cuantificó mediante qPCR utilizando Brilliant II SYBR Green y Kapa SYBR fast (Kapa

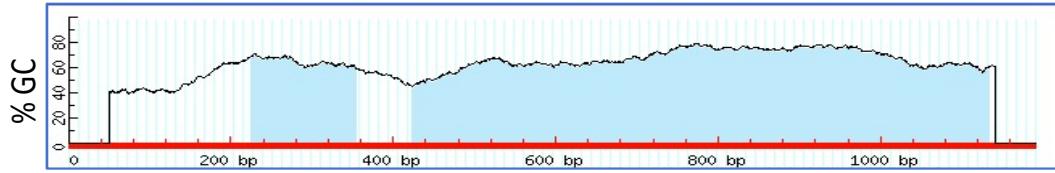
Biosystems). El análisis qPCR se realizó por triplicado a partir de cADN utilizando el equipo Rotor-Gene Q (Qiagen). Los cambios de expresión se calcularon siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando ciclofilina-A (Cyc) como control de normalización.

Tabla 5: Secuencia de partidores para PCR en tiempo real.

| Gene | Forward primer | Reverse primer |
|--------------|-------------------------------|------------------------------|
| <i>Lonp1</i> | 5'- CCGTCAGTATGGCTGTTCCA -3' | 5'- GAAGACGCCAACATAGGGCT -3' |
| Cyc | 5'- GGCAATGCTGGACCAACACAA -3' | 5'- GTAAAATGCCGCAAGTCAAAG-3' |

5.9 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-Mecp2):

Para determinar la unión de Mecp2 a zonas reguladoras del gen *Lonp1*, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina para Mecp2 en el promotor de *Lonp1* y cercano al TSS, se utilizó el kit comercial de inmunoprecipitación de la cromatina EpicQuik (Epigentek, cat P-2003) a partir de tejido del hipocampo de ratones SAMR1 de 7 meses y SAMP8 de 2 y 7 meses. Brevemente, los hipocampos se disgregaron y entrecruzaron en formaldehído al 1% durante 10 minutos. Tras lavar el formaldehído, los homogeneizados de hipocampo fueron lisados brevemente en 2,5% SDS contenido en el tampón de lisis seguido de sonicación durante diez ciclos con intervalos de 30 segundos para fragmentar el ADN genómico utilizando Bioruptor@Pico (Diagenode). Los fragmentos de ADN se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa obteniéndose fragmentos entre 200 y 500 pb (Figura 3). Posteriormente, los complejos ADN-Proteína se precipitaron con 3 µg de anticuerpo anti-Mecp2 (Abcam, ab2828). El ADN se obtuvo utilizando el kit EpicQuik Chromatin Immunoprecipitation (Epigentek, cat P-2003), siguiendo las instrucciones del fabricante. La unión de Mecp2 al promotor de *Lonp1* se evaluó mediante PCR en tiempo real a partir del ADN inmunoprecipitado (kit SYBR Green) (Torres et al., 2017). En la figura 2 se ilustró la ubicación de los partidores en la secuencia del gen *Lonp1*, utilizados para los ensayos de ChIP-Mecp2.



1 GTTGTATCAACAAAGAACGCTGAAAAGACTAAAGTTAAGGAGGGTGCCTGTACTTTCTTCGAT
 71 GCCTCAGAACACAGAACCTTGATGGCAGTAGAAAAACAGAACGCAGTACTAA
 141 GGTACAGCTTGGACAGGACAAACCAGTAGTTGTAGGAACGGAGGGGCCACGCTTCTCCAGGCCCC
 211 TCCTAGAGCGATGCCCGCCCGCCCTCCGCACAAGCTCCAGTCTGGAGTCACCGCTCTGCCACGCC
 281 ATGTCAAGCCCCGACCTTGAGCCCGCCTCGGCCATATCCCTGATTCCAGTTCCCAATCCCTGCC
 351 GTGGAGCGCCCCCATTGGACACACACAC **CAGTCCTGCTTCTCCGTCA** ATGTTCCCAAGCTTA
 421 CCTCTCACTTTCATCCAGATCCTCAAAGCTCTCTA **GAACATCCTCATCGGGCCA** CGCCCCCTGC
 491 CGTCCAACCTCCAAGCCCCGCTTGAGCCTGAACCACGCCCTACTCCGCCCTCCATCCCCAACCCAG
 561 TCTCCCTGTGACCACGCCACTCACTCACCTATTCAAGCTCCGCTCTCCAGCCGAAGCACGCGAGCG
 631 TCATCACGTGCGCAAACGGGGCGAGCAGAGATGACGTAAGTGCCTGCGCCGTCA **GTCAGT**
 701 ATGGCGCGAGCACAGGCTACGTGCGCTCTGGCGCTGCGCGGTGCTGGTTCTGCCGGCCGCTGC
 771 TGGCTGTCACCGGAGGCCGGTCCCGAGCGCGTCCGGTCTGGCTGCCGAGGATGTCGGGC
 841 CATGTCAGCTCCCTGGGCGGCCGCGTTCTCCCGCGGGTCCAGTGGCGGGCTGTGGACTCGGG
 911 AACCGCGGTGGCAGCGACGAGACCTCCGAGGGCGGTGCGGAGGACGGGCCACGGCGAGCACCGGG
 981 GCCCGGTCGTACAGCGCTCGGCCCATGACCGTCCGGATGTGTTCCCTACCTGCCGCTCATGCC
 1051 CACCCGCAACCC **TGTGTTCCCGCGCTTATCA** AGATCGTGGAGGTAACCAGAGCCCCGCTCC
 1121 TGCTAGCGGACCGAGTGGTCTCTA **GCTCCCTCGCGTCAAGAAA** CTGGAAACCGCACTCCTGCTG

Figura 3: Secuencia del promotor y región río abajo del TSS de *Lonp1*. Se presenta la secuencia del promotor de *Lonp1* y la región río abajo del TSS (ATG marcado en verde). En rojo se representa los partidores 3F y en azul los partidores 5F para los ensayos de ChIP-Mecp2.

Tabla 6: Secuencia de partidores para evaluar ChIP-Mecp2 por PCR tiempo real.

| Gene | Forward primer | Reverse primer |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>ChIP 3F Lonp1</i> | 5' CAGTCCTGCTTCTCCGTCA 3' | 5'- TGGCCCGATGAAGGATGTTC -3' |
| <i>ChIP 5F Lonp1</i> | 5'- TGTGTTCCCGCGCTTATCA -3' | 5'- TTTCTTAGACGCGAGGGAGC -3' |

Sonicación de la cromatina
desde hipocampo de ratón

St 7 ciclos 10 ciclos

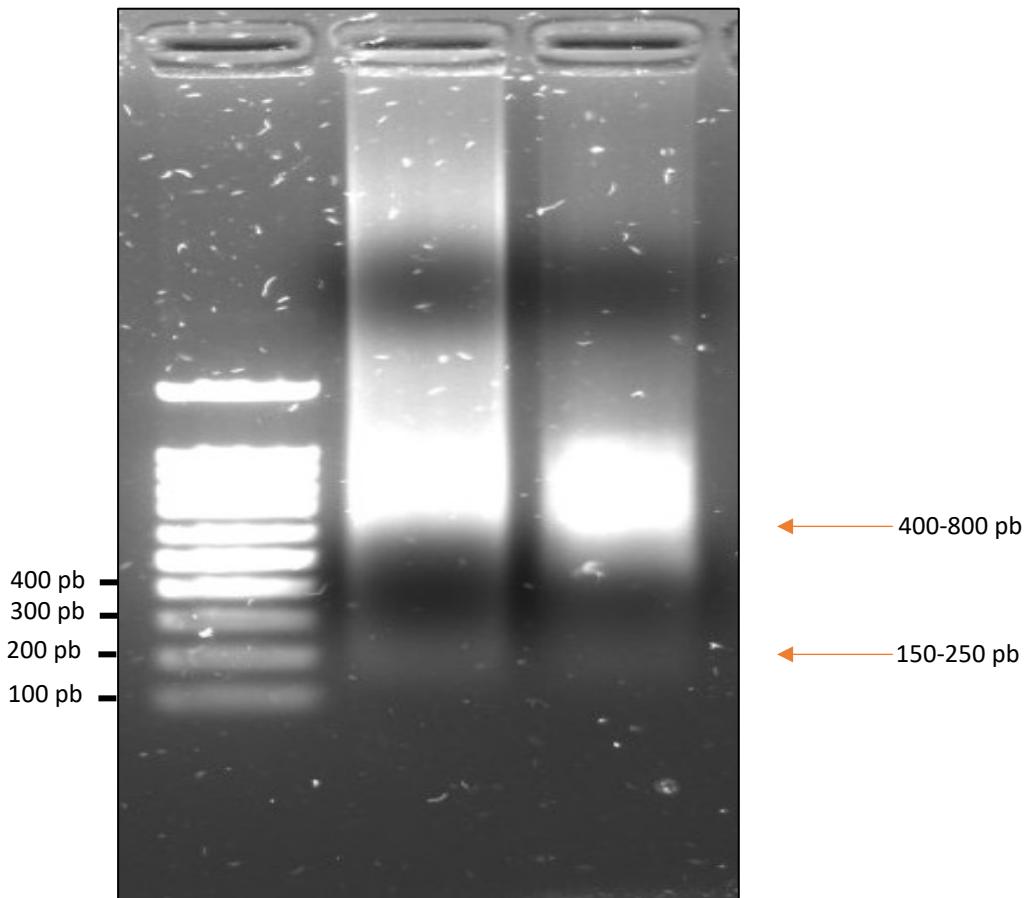


Figura 4: Estandarización de la fragmentación de la cromatina obtenida de hipocampo de los ratones SAMR1. Fragmentación de la cromatina extraída desde el hipocampo de ratones SAMR1 adultos (2 meses) mediante el equipo Bioruptor Pico. El producto de fragmentación fue resuelto en gel de agarosa al 2%. Se observan fragmentos enriquecidos entre 150 a 300 pb. Estándar de peso molecular de 100 pb.

5.10 Preparación de extractos de proteínas y Western Blot:

Para determinar los cambios en los niveles de proteínas de Lonp1 y Tau PHF-1 en las fracciones subcelulares del hipocampo de los ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses de edad, se utilizó la técnica de disección del hipocampo en hielo y procesados inmediatamente como se ha descrito previamente (Torres et al., 2023). Brevemente, el tejido del hipocampo se homogenizó en tampón HEPES mediante un homogeneizador de vidrio y, a continuación, se pasaron secuencialmente 20 veces up and down a través de las micropipetas p-1000, p-200, p-10, y 20 up and down por jeringa tipo insulina. Las muestras de proteínas se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Las concentraciones de proteínas se determinaron utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA. Para todos los análisis de Western Blot se utilizaron 30 µg de proteínas totales. Las muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE, seguido de inmunotransferencia en membranas de PVDF. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios y anticuerpos IgG de ratón o conejo conjugados con peroxidasa (Pierce) y se visualizaron con un kit ECL (sustrato Luminata Forte Western HRP, Millipore, Burlington, MA, EE.UU.).

5.11 Preparación de fracciones subcelulares del hipocampo:

Para determinar los cambios en los niveles de proteínas de Lonp1 y Tau PHF-1 en las distintas fracciones subcelulares del hipocampo, se realizó fraccionamiento subcelular del hipocampo mediante centrifugación diferencial. Los hipocampos de los ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses de edad fueron extraídos, suspendidos, y lisados en tampón MSH (230 mM manitol, 70 mM sacarosa, 5 mM Hepes, pH 7,4), suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas en un homogeneizador de vidrio. Los homogeneizados se centrifugaron a 600 × g durante 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido se utilizó para la extracción de proteínas nucleares; se resuspendió 3 veces en tampón MSH y homogenizado en vortex por 30 segundos, y centrifugado a 600 × g durante 10 minutos a 4°C. El pellet fue resuspendido en 200 µL de tampón RIPA y agitación por 30 minutos a 4°C. Finalizada la agitación, se resuspendió el homogeneizado 20 up and down por jeringa tipo insulina. Las muestras de proteínas se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y el sobrenadante obtenido corresponde a las proteínas

nucleares. La fracción del sobrenadante obtenida a $600 \times g$, se procedió a realizar una centrifugación de $8000 \times g$ durante 10 minutos; el pellet obtenido corresponde a la fracción enriquecida mitocondrial, se lavó dos veces en tampón MSH, y el sobrenadante obtenido corresponde a citoplasma libre de mitocondria. La concentración de proteínas de cada una de las fracciones subcelulares del hipocampo se determinó mediante un kit estándar BCA (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) Para todos los análisis de Western Blot se utilizaron 30 μg de proteínas totales.

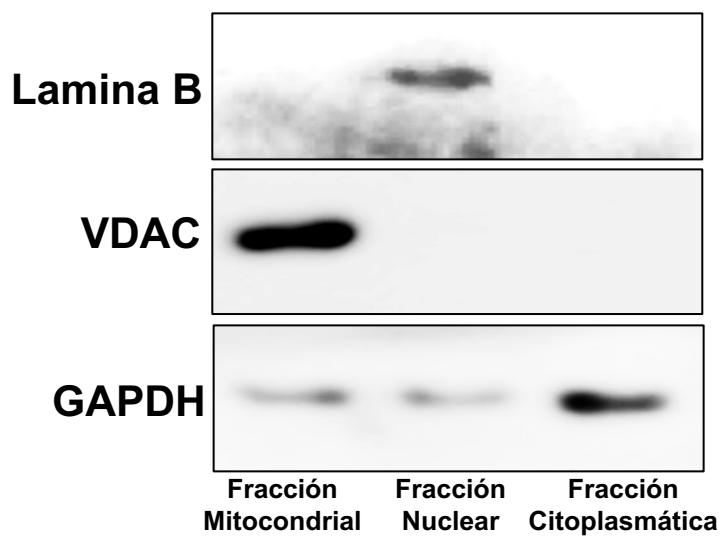


Figura 5: Controles de purificación de las distintas fracciones subcelulares del hipocampo obtenidas por centrifugación diferencial. Western Blot para marcador de núcleo: Lamina B, marcador mitocondrial: VDAC y marcador citoplasmático: GAPDH desde una fracción mitocondrial enriquecida, fracción nuclear y citoplasmática desde extractos de hipocampo de ratones SAMP8 de 2 meses de edad.

5.12 Inmunoprecipitación de las proteínas Lonp1 y Tau PHF-1:

Para obtener la proteasa Lonp1 y Tau PHF-1 endógena a partir del hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses de edad, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación, para los ensayos de degradación *in vitro* y medición de la actividad proteolítica de Lonp1 (FITC-Caseína). Brevemente, los hipocampos se lisaron en tampón de inmunoprecipitación. 200 µg del lisado de proteínas se incubaron con beads de proteína G/Sefarosa (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durante 30 minutos a 4°C y luego se centrifugó para eliminar las uniones inespecíficas. Posteriormente el sobrenadante fue incubado con anticuerpos anti-Lonp-1 (Termofisher; cod: PA551692) y Tau PHF-1 (Donado por el Dr. Peter Davies, Cat Alzforum) por dos horas. Después de ello, el extracto fue incubado con beads de proteína G por 1 hora a 4°C. Finalmente, los complejos de inmunoprecipitación fueron centrifugados a 3000 rpm por 1 minuto, lavados tres veces en buffer de inmunoprecipitación y nuevamente centrifugados a 3000 rpm por 1 minuto (Tapia-Rojas et al., 2015). Los inmunoprecipitados de Lonp1 endógena se utilizaron inmediatamente para los ensayos de degradación *in vitro* y ensayos de actividad proteolítica de Lonp1 por FITC-Caseína.

5.13 Ensayos de actividad proteolítica de Lonp1 por FITC-Caseína:

Para determinar la actividad proteolítica endógena de Lonp1 en el hipocampo de ratones SAMP8 y SAMR1 de 2 y 7 meses de edad, se utilizó el kit comercial FITC-Caseína. Brevemente, para cada muestra inmunoprecipitada de Lonp1, se añadieron 100 µL de tampón de actividad de Lonp1, 100 µL del sustrato FITC-Caseína (0,1 mg/mL) y ATP (2 mM). La cinética de degradación de la FITC-Caseína se midió por el aumento de la fluorescencia (unidades de fluorescencia relativa) en el lector de placas Biotek Synergy HTX a 485 nm de excitación y emisión a 535 nm durante 60 minutos.

5.14 Ensayos de degradación *in vitro* de Tau PHF-1:

Para determinar si Tau PHF-1 es sustrato de degradación de la proteasa Lonp1, se utilizó la técnica de ensayos de degradación *in vitro*. Para los ensayos de degradación *in vitro*, la proteína Tau PHF-1 (Ser396/Ser404) y la proteasa Lonp1

endógenas fueron inmunoprecipitadas e incubadas en buffer de reacción de Lonp1 en presencia y ausencia de 2 mM de ATP. Los controles utilizados: Inhibidor CDDO-me (Lee et al., 2022) y activador de Lonp1 84B10 (Bai et al., 2023). La reacción fue realizada a los tiempos (0-1-2-4) horas e incubado a 30 °C. Finalizado los tiempos de incubación las muestras se analizaron por Western Blot y se determinó la eficiencia de degradación de la proteína Tau PHF-1 con anticuerpo anti-Tau PHF-1 y la tasa de hidrólisis de ATP por la proteasa Lonp-1 (Puri & Karzai, 2017).

5.15 Medición de la concentración de ATP:

Para determinar el consumo de ATP de la proteasa Lonp1 en el ensayo de degradación *in vitro*, y la producción de ATP de los ensayos ex-vivo de inhibición de la actividad proteolítica de Lonp1, se utilizó un kit de bioluminiscencia de la medición de ATP, se midió en el sobrenadante de 25 µg de las mitocondrias después de 30 minutos de incubación con sustratos oxidativos (piruvato y malato), usando un kit de ensayo de bioluminiscencia de ATP (Olesen et al., 2020; Torres et al., 2021).

5.16 Preparación de rebanadas del hipocampo:

Para determinar si la inhibición de la actividad proteolítica de Lonp1 causa la acumulación de Tau PHF-1, y determinar el efecto de la inhibición de la actividad proteolítica de Lonp1 en la función mitocondrial, se utilizó la técnica de tratamiento ex-vivo de rebanadas de hipocampo. Para la preparación de las rebanadas de 350 µm del hipocampo de ratones SAMR1 de 3 meses de edad, las rebanadas transversales del hipocampo dorsal fueron obtenidas en solución de corte en frío y saturado de oxígeno usando un chopper. Los cortes fueron incubados y mantenidos en líquido cefalorraquídeo artificial por una hora, para luego ser tratados en líquido cefalorraquídeo artificial como vehículo de los fármacos CDDO-me y Sesamin. Durante la disección, corte y experimentación, las rebanadas fueron oxigenadas en 95% O₂ y 5% CO₂ (Montecinos-Oliva et al., 2020).

5.17 Tratamiento con inhibidores de la actividad proteolítica de Lonp1:

Se utilizaron los fármacos reportados de Lonp1: CDDO-me y Sesamin para inhibir la actividad proteolítica de Lonp1. Para los tratamientos con CDDO-me y Sesamin en rebanadas de hipocampo, fueron mantenidas en líquido

cefalorraquídeo artificial, 5% CO₂ y 95% O₂ (Montecinos-Oliva et al., 2020). Se utilizó la concentración de 40 μM para Sesamin (El doble de la concentración reportada como IC50, (Wang et al., 2010)) y 6 μM 2-cyano-3,12-dioxooleana- 1,9-dien-28-oicacid [CDDO] (El doble de la concentración reportada como IC50, (Lee et al., 2022)) por 5 horas. Terminado el tratamiento se aislaron las mitocondrias de las rebanadas de hipocampo y se midió la actividad proteolítica de Lonp1 con caseína y TFAM (controles positivos de degradación de Lonp-1) y Tau PHF-1 por análisis de Western Blot (Torres et al., 2021).

5.18 Análisis de los niveles de Tau PHF-1 en la mitocondria:

Para determinar los niveles de proteínas de Tau PHF-1 en una fracción enriquecida de mitocondrias de rebanadas del hipocampo, se realizó la técnica de centrifugación diferencial. Se aisló una fracción enriquecida en mitocondrias desde hipocampo de ratones SAMP8 y SAMR1 de 2 y 7 meses de edad. El hipocampo fue removido y resuspendido en buffer MSH. Los homogeneizados se centrifugaron a 600 x g durante 10 minutos a 4°C y se eliminaron núcleos y restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 8000 x g durante 10 minutos. El pellet mitocondrial se lavó dos veces en tampón MSH. La concentración de proteínas se determinó usando un kit estándar de BCA (Jara et al., 2018).

5.19 Medición del potencial de membrana mitocondrial:

Para determinar el efecto de la inhibición de la actividad proteolítica de Lonp1 sobre la función mitocondrial, se midió el potencial de membrana mitocondrial de las mitocondrias obtenidas de los ensayos ex-vivo de inhibición de la actividad proteolítica de Lonp1, se utilizó la sonda Mito Tracker™ red CMXROS (ThermoFisher, cat M7512) para medir potencial de membrana mitocondrial. Se incubó con la sonda Mito Tracker™ red CMXROS las mitocondrias totales obtenidas desde hipocampo de ratones SAMP8 y SAMR1 de 2 y 7 meses (Tapia-Rojas, Torres, et al., 2019).

5.20 Medición del consumo de oxígeno mitocondrial:

Para determinar el efecto de la inhibición de la actividad proteolítica de Lonp1 sobre la función mitocondrial, se midió el consumo de oxígeno mitocondrial de las mitocondrias obtenidas de los ensayos ex-vivo de inhibición de la actividad

proteolítica de Lonp1, se utilizó la sonda fluorescente para medir el consumo de oxígeno en 50 µg de proteínas de una fracción enriquecida mitocondrial, se incubaron con sustratos oxidativos piruvato y malato durante 30 minutos a 37°C, utilizando un kit de ensayo de consumo de O₂ extracelular (ab197243, Abcam). La sonda fluorescente se reduce en presencia o aumento de oxígeno en el medio, lo que reduce la intensidad de fluorescencia. El consumo de oxígeno por la fracción enriquecida de mitocondrias aumenta la intensidad de la fluorescencia debido a la menor cantidad de oxígeno disponible. En este ensayo, la fluorescencia obtenida es proporcional al consumo de O₂ por la fracción mitocondrial (Torres et al., 2023).

5.21 Medición de la producción de ROS:

Para determinar el efecto de la inhibición de la actividad proteolítica de Lonp1 sobre la función mitocondrial, se midió la producción de ROS utilizando la sonda fluorescente CM-H2DCFDA (C6827, Thermo Fisher Scientific). 25 µg de proteínas de una fracción enriquecida en mitocondrias del hipocampo se diluyó en 100 µL de tampón de respiración KCl con los sustratos oxidativos piruvato y malato, y la adición de 25 µM DCF. A continuación, se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 8000 × g durante 10 minutos a 4°C. Finalizada la incubación, se midió la producción mitocondrial de ROS en BioTek Synergy HT (Ex: 485 nm, Em: 530 nm).

5.22 Ensayo de medición de carga de proteínas desplegadas:

Para determinar la cantidad de proteínas desplegadas en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses de edad, se utilizó la sonda TPE-MI. Se midió en 10 µg de proteínas de las fracciones citoplasmática y una fracción enriquecida mitocondrial. Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con la sonda fluorescente TPE-MI (Cat HY-143218, MCE). Finalizada la reacción, se midió el ensayo en Biotek Synergy HT (Ex: 350nm, Em: 470 nm). En este ensayo, la fluorescencia obtenida es proporcional a la carga de proteínas desplegadas (Chen et al., 2017).

5.23 Análisis estadístico:

Los resultados se presentan como gráficos de barras que indican la media ± desviación estándar. La significancia estadística para las comparaciones de dos grupos experimentales se determinó mediante la prueba T- Student no pareada de dos colas para datos paramétricos. Los valores $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***), se consideraron estadísticamente significativos. La significancia estadística de las comparaciones para más de dos grupos experimentales se determinó mediante ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni. Los valores $p > 0.05$ (no estadísticamente significativos) y $p \leq 0.05$ (estadísticamente significativos). En las figuras, los valores de p entre 0,01 y 0,05 se indican con un asterisco (*), los valores de p entre 0,001 y 0,01 se indican con dos asteriscos (**), y los valores de p inferiores a 0,001 se indican con tres asteriscos (***). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism (GraphPad Software, Inc.).

6. Resultados

6.1 Predicción y niveles globales de metilación de islas CpG en la región promotora del gen *Lonp1*.

Estudios de metilación del ADN genómico del gen *LONP1* en células humanas han identificado metilación en 1 sitio CpG del promotor y de la región reguladora de *LONP1*, lo que sugiere que la expresión de *LONP1* es modulada por el estado de metilación del ADN (Gruzieva et al., 2017; Helliwell et al., 2020). Para determinar si el gen *Lonp1* de ratón tiene islas CpG putativas, utilizamos una combinación de 2 reglas clásicas, con los programas de predicción de islas CpG, MethPrimer y Methyl Primer Express, que utiliza los siguientes criterios de selección: 1) El tamaño de la región debe ser mayor a 100 pb; 2) El porcentaje GC debe ser mayor al 50% y 3) Debe contener una razón CpG observado/esperado mayor al 60%. Además, utilizamos 4 modelos de predicción estándar de islas CpG: Takai & Jones, Gardiner-Garner, Emboss CpG plot y CpGProD que utilizan los siguientes criterios de selección: 1) El tamaño de la región debe ser entre 200 a 500 pb; 2) El porcentaje GC debe ser entre el 60 a 65% y 3) Debe contener una razón CpG observado/esperado entre 60 a 65 %. Buscamos islas CpG en la región promotora (-3000 a 0 pb) y 5'UTR (+1000 pb) del gen *Lonp1* en *Mus musculus* para estudiar la relación entre la expresión de este gen y la regulación epigenética por metilaciones del ADN. Como se observa en la **figura 6 A**, identificamos 4 islas CpG con los métodos clásicos de predicción; tamaño de 162 pb (Isla CpG 1), 125 pb (Isla CpG 2), 129 pb (Isla CpG 3) y 774 pb (Isla CpG 4), entre las regiones -2238 y +596 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen *Lonp1*, de las cuales se estudiarán las islas CpG más cercanas al TSS, ya que se ha descrito que las metilaciones del ADN (^{5me}CpG) más importantes para la regulación génica están enriquecidas en la región -400/+400 con respecto al TSS (Aerts et al., 2004). Con los modelos de predicción de islas CpG estándar identificamos las islas CpG 3 y 4 que están conservadas en la región de interés: (i) la isla CpG 4, encontrada por todas las metodologías empleadas y que abarca la región de -560 pb y +800 pb con respecto al TSS, y (ii) la isla CpG 3, encontrada por 2 de los 6 métodos empleados y que abarca la región de -520 y -250 pb con respecto al TSS (**Figura 6B**).

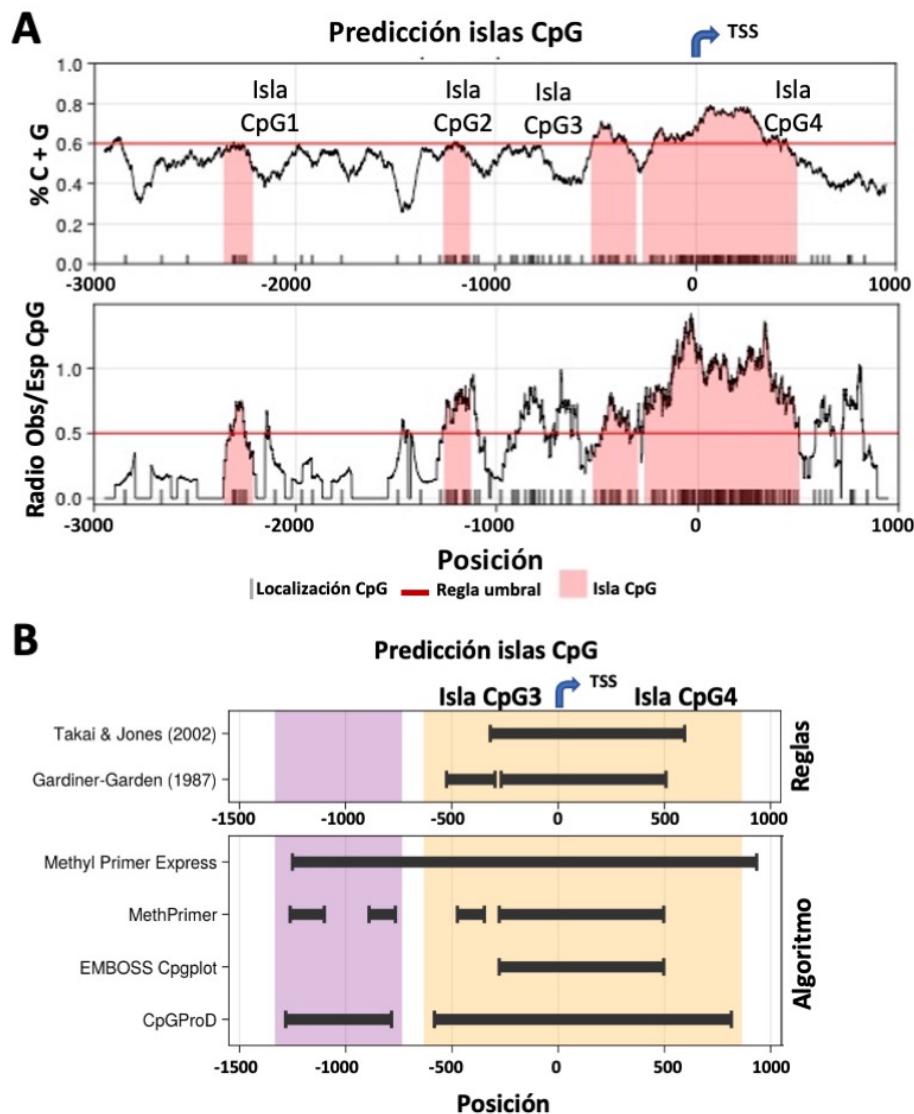


Figura 6: Predicción de islas CpG en la región promotora y 5'UTR de *Lonp1* en base a la secuencia de referencia *Mus Musculus*. Para la predicción se consideró una secuencia de 4000 pares de bases (pb) (3000 pb antes del TSS y 1000 pb después del TSS). (A) Predicción de islas CpG propuesta por MethPrimer y Methyl Primer Express, se identificaron 2 islas CpG de un tamaño de 129 pb y 774 pb (color rojo) entre las regiones -444 y +526 con respecto al TSS del gen *Lonp1*. Las líneas verticales rojas mostradas bajo la línea roja horizontal representan los dinucleótidos CpG que se identificaron en la secuencia de nucleótidos de 4000 pb. Criterios para identificar islas CpG: 1) Tamaño de la región > 100 pb; 2) % de GC mayor al 50% y 3) Razón CpG observado/esperado mayor al 60%. (B) Predicción de islas CpG propuesta por Gardiner-Garden (1987), y consenso de islas CpG putativos en regiones genómicas cercanas al TSS de *Lonp1* mediante 6 programas bioinformáticos: MethPrimer, Methyl Primer Express, Takai & Jones, Gardiner-Garden, EMBOSS Cpgplot y CpGProD.

En concordancia, los resultados de predicción de islas CpG sugieren que *Lonp1* podría estar regulado por modificaciones epigenéticas, debido a la presencia de islas CpG cercanas al TSS. Para corroborar las metilaciones de ADN predichas (^{5me}CpG), utilizamos la técnica de conversión de bisulfito de sodio del ADN genómico y MSP-PCR. El tratamiento con bisulfito de sodio convierte las citosinas no metiladas a uracilos y tras la reacción de PCR a timina, pero no convierte las citosinas metiladas. Luego, con el programa Methprimer diseñamos los partidores que flanquean la isla CpG 3 y utilizamos como templado el ADN genómico convertido por bisulfito de sodio para la reacción de MSP-PCR (PCR específica de metilaciones). Para evaluar los cambios de metilación global del promotor de *Lonp1*, realizamos la razón de metilación/no metilación, que se calculó midiendo las densitometrías de los productos de MSP-PCR metilado (**Figura 7A**), y las densitometrías de los productos del MSP-PCR no metilado, ambas obtenidas desde geles de agarosa al 2,5% (**Figura 7B**). Encontramos un aumento en la metilación de la isla ^{5me}CpG 3 en ratones SAMP8 envejecidos ($1.610 \pm 0,1418$) en comparación con ratones SAMP8 de 2 meses ($1.273 \pm 0,1372$), indicado por la razón de metilación/no-metilación (**Figura 7C**). No observamos cambios en esta razón de metilación/ no metilación en ratones SAMR1. Por lo tanto, en ratones SAMP8 envejecidos aumenta la metilación en la región promotora -1250 y -750 pb (Isla CpG3) con respecto al TSS del gen *Lonp1*.

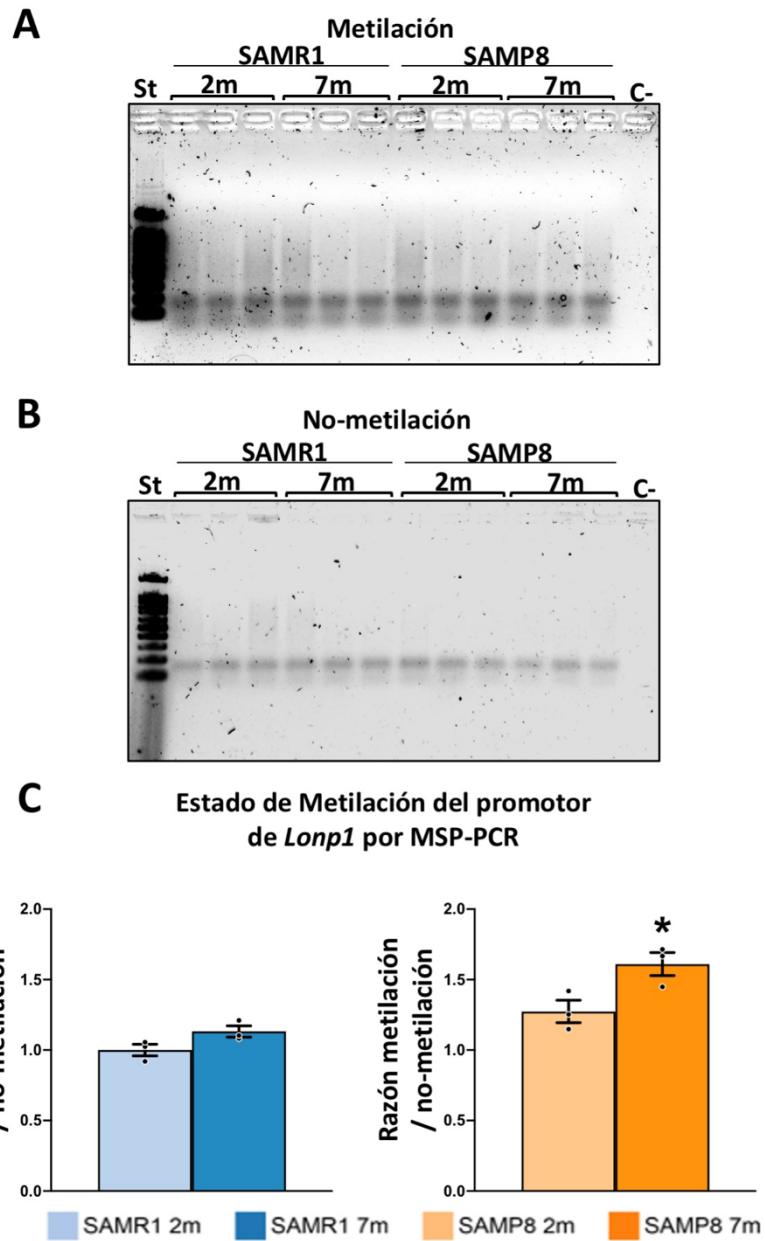


Figura 7: Aumento en la metilación global del promotor de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos. Niveles de metilación del promotor de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses mediante MSP-PCR de muestras de ADNg tratadas con bisulfito de sodio. (A) Producto de MSP-PCR obtenido con partidores que se unen al producto de oxidación de CpG metiladas de ~ 210 pb para amplificar la isla CpG 3 (129 pb) metilada en el promotor de *Lonp1*. (B) Producto de MSP-PCR obtenido con partidores que se unen al producto de conversión de las CpG no metiladas. Producto de MSP-PCR ~ 209 pb para amplificar las islas CpG 3 (129 pb) no metilada. (C) Cuantificación de la razón de los productos de MSP-PCR metilado y no metilado. Estándar de peso molecular de 100 pb. Gel de agarosa al 2,5 %. N= 3. Las barras representan las medias ± SD. p<0.05 (*). El análisis estadístico t-student no pareada de dos colas.

6.2 El gen codificante para la proteasa *Lonp1* es blanco de regulación por *Mecp2*.

Mecp2 es un lector epigenético que reconoce las metilaciones del ADN, pertenece a una familia de proteínas de unión al ADN metilado y es la proteína más expresada de esta familia en el cerebro (Tillotson & Bird, 2020; Torres et al., 2019). *Mecp2* regula la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales relevantes en la función bioenergética y morfología mitocondrial, como por ejemplo *NDUFA1* y *TOMM7* (Pecorelli et al., 2013). Además, un estudio de secuenciación profunda de RNA en hipocampo de ratas knockdown para *Mecp2* y ratas WT mostró que *Mecp2* regula la expresión de proteasas mitocondriales, como la serina proteasa Htra2 y la proteasa dependiente de ATP Clpx que presenta una cercanía genómica con el gen *Lonp1* (Cheng et al., 2017). Además, ratones KO para *Mecp2* presentan niveles aumentados de transcripto de *Lonp1* (Anexo 3). Para determinar si el gen *Lonp1* es regulado por *Mecp2*, realizamos un primer acercamiento mediante un análisis bioinformático de los motivos de unión de *Mecp2* a sus genes blancos previamente reportados por secuenciación de la inmunoprecipitación de la cromatina para *Mecp2* (ChIP-seq *Mecp2*). Para la generación del motivo de *Mecp2* utilizamos un algoritmo propio que alinea secuencias cortas degeneradas de ADN con una región genómica dada (Genes blanco de *Mecp2*). Analizamos 3 motivos de unión reportados para *Mecp2*, proveniente de estudios de secuenciación de ChIP-*Mecp2*, luego buscamos este motivo de unión de *Mecp2* en la secuencia de nucleótidos de la región promotora del gen *Lonp1*. Observamos que el promotor de *Lonp1* presenta motivos de unión para *Mecp2*, y en la Figura 8A, barras azules, observamos el total de posibilidades de encontrar este motivo en el promotor de *Lonp1*. Además, *Mecp2* podría unirse a otros motivos en el promotor de *Lonp1* que presentan homología de secuencia parcial (menos de un 75% de homología en las posiciones nucleotídicas) con el motivo consenso (**barras verdes en la Figura 8A**). Por último, también se puede encontrar el motivo de unión para *Mecp2* exacto en *Lonp1* (100% de homología de secuencia con el motivo consenso al que se une este regulador epigenético) (**barras naranjas en la Figura 8A**). Para corroborar este análisis y confirmar la unión de *Mecp2* al promotor de *Lonp1*, realizamos la

técnica de inmunoprecipitación de la cromatina para Mecp2 (ChIP-Mecp2), seguido de una elución del ADN de la inmunoprecipitación que se utiliza como templado para la reacción de qPCR, para determinar el enriquecimiento de unión de Mecp2 del inmunoprecipitado sobre el ADN de entrada (Input). Se utilizó control de inmunoprecipitación no específica un anticuerpo contra IgG y como control positivo el gen *H19*, gen regulado por Mecp2 de manera dependiente de la metilación (Drewell et al., 2002). Se estandarizó la sonicación de la cromatina en un equipo automatizado Bioruptor Pico. Se generaron fragmentos de ADN entre 200 a 500 pb aproximadamente, a 10 ciclos de sonicación con intervalos de 30 segundos desde hipocampo de ratones SAMR1 de 2 meses (**Figura 4**). Luego, se estandarizaron dos juegos de primers (3F y 5F) dirigidos al promotor y 5'UTR de *Lonp1* con ADN genómico. Finalmente, procedimos a evaluar la unión de Mecp2 al promotor de *Lonp1*. Se utilizaron los hipocampos de ratones SAMR1 de 7 meses y SAMP8 de 2 meses y 7 meses. El ratón SAMR1 de 7 meses se utilizó como control adulto (modelo murino de envejecimiento normal), los ratones SAMP8 2 meses como control adulto (modelo murino de envejecimiento a temprana edad) y ratones SAMP8 envejecidos (SAMP8 7 meses). En los experimentos de qPCR, consideramos al Input como normalizador de la reacción de qPCR de *Lonp1*. Observamos una interacción directa de Mecp2 con el promotor proximal de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 (**Figura 8B y 8C**). La unión de Mecp2 al promotor de *Lonp1* disminuye en ratones SAMP8 envejecidos (incremento en promedio de 4 veces con respecto al Input) en comparación a SAMP8 adultos (incremento en promedio de 10 veces con respecto al Input). No observamos diferencias significativas al evaluar los grupos SAMR1 de 7 meses y SAMP8 envejecidos (**Figura 8B y 8C**), lo que nos sugiere que la unión de Mecp2 al promotor de *Lonp1* es espacio-temporal o mecanismos de regulación del ARNm de *Lonp1* son independiente de Mecp2 en el hipocampo de ratones SAMR1 de 7 meses de edad. En resumen, nuestros resultados muestran que el gen *Lonp1* es un gen blanco de Mecp2 y que este factor de transcripción actúa como un represor transcripcional del gen *Lonp1*.

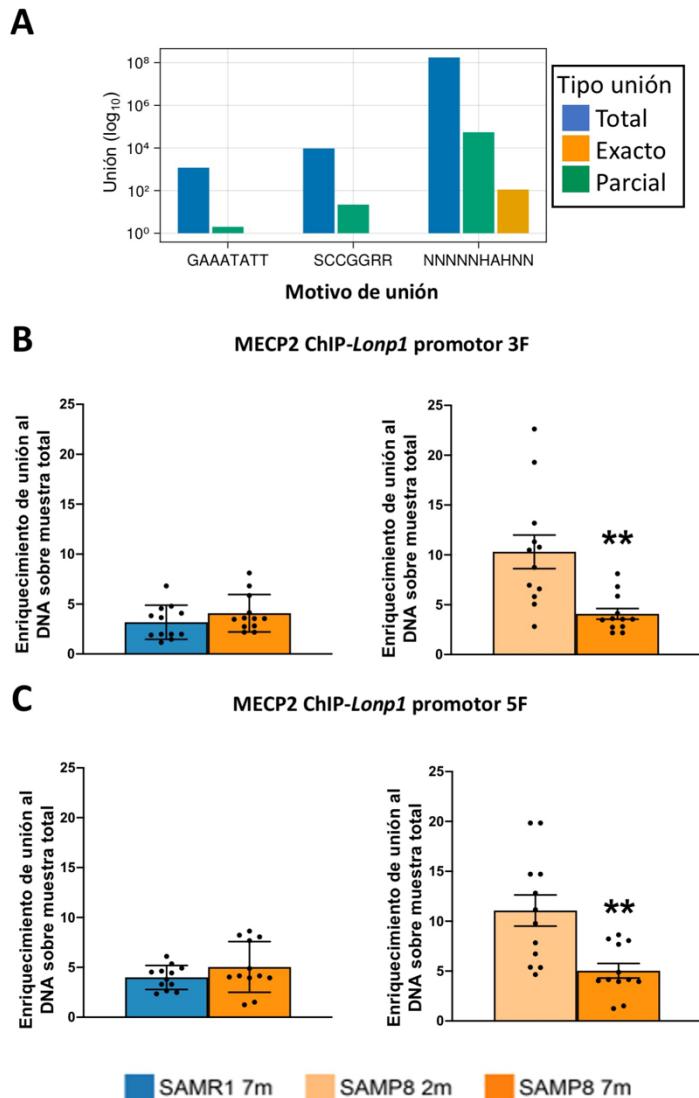


Figura 8: Interacción de Mecp2 con el promotor de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8. (A) Predicción de sitios consenso de unión de Mecp2 al promotor de *Lonp1* mediante bioinformática usando reportes de ChIP-seq-Mecp2. (B) Inmunoprecipitación (IP) de cromatina utilizando el anticuerpo anti-Mecp2. El ADN eluido del ChIP-Mecp2 se evaluó con partidores al promotor y 5'UTR de *Lonp1*. Análisis ChIP de Mecp2 mediante cuantificación por qPCR del promotor 3F de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses. (C) Análisis ChIP de Mecp2 mediante cuantificación por qPCR del promotor 5F de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses. N= 3. Las barras del gráfico representan las medias \pm SD. p<0.05 (*), p < 0,01 (**). Análisis estadístico t-student no pareada de dos colas.

6.3 Niveles de proteína y estado de fosforilación de Mecp2 en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8.

Estudios han demostrado que la fosforilación en serina 80 y serina 421 de Mecp2 regulan la unión y disociación de Mecp2 a los promotores de sus genes blanco respectivamente, y que las fosforilaciones en Mecp2 son relevantes en la expresión de genes que promueven la actividad neuronal (Tai et al., 2016; Tao et al., 2009). Específicamente, la fosforilación en serina 80 de Mecp2 promueve su unión a los promotores de sus genes blanco (Tao et al., 2009) y la fosforilación en serina 421 de Mecp2 disocia su unión a los promotores de sus genes blanco (Zhou et al., 2006). En nuestros 4 grupos experimentales medimos los niveles de proteína Mecp2 total y las fosforilaciones en serina 80 y serina 421. No observamos diferencias significativas en los niveles de proteína de Mecp2 total o en sus formas fosforiladas en los ratones SAMR1 de 2 y 7 meses (**Figura 9A y 9B**). En ratones SAMP8 envejecidos observamos una disminución de los niveles de Mecp2 total ($0,848 \pm 0,2773$), Mecp2 fosforilado en serina 80 ($0,688 \pm 0,2162$) y la razón Mecp2 serina80/Mecp2 total ($0,606 \pm 0,1844$) en comparación con SAMP8 de 2 meses (Mecp2 total: $1.000 \pm 0,3458$; Mecp2 p-serina 80: $1.000 \pm 0,1092$; razón Mecp2 serina80/Mecp2 total: $1.010 \pm 0,1264$) (**Figura 9A y 9C**). Estos resultados sugieren que la disminución de Mecp2 y de su fosforilación que regula la unión a sus genes blanco (serina 80), podría reducir la unión y regulación transcripcional de Mecp2 al gen *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos. En conjunto, con todos los resultados obtenidos de Mecp2 en la regulación transcripcional del gen *Lonp1* podemos concluir que Mecp2 se une al promotor de *Lonp1* (ChIP-Mecp2), y que en el hipocampo ratones SAMP8 envejecidos hay una menor unión de Mecp2 y fosforilación en Serina 80 al promotor de *Lonp1*.

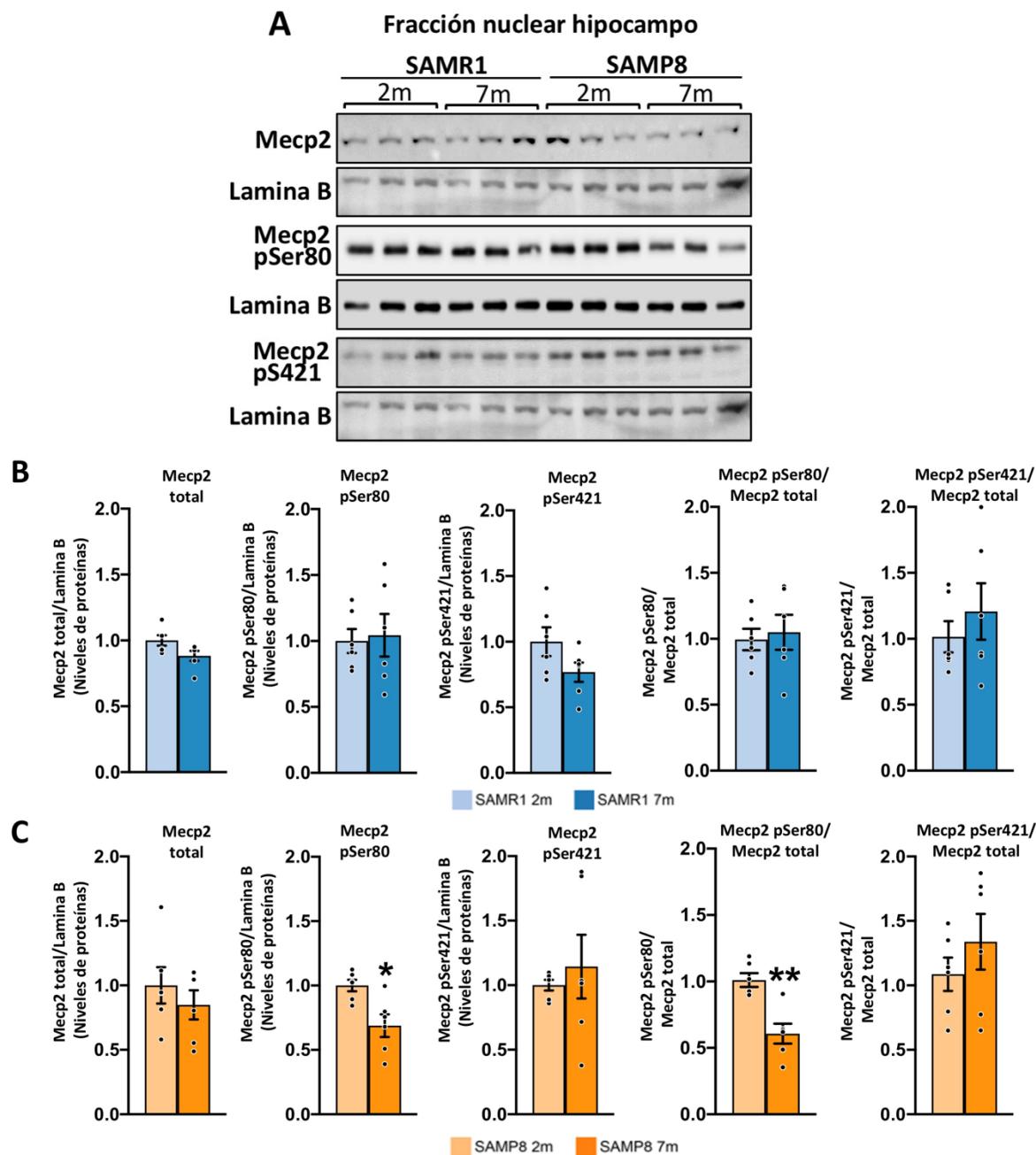
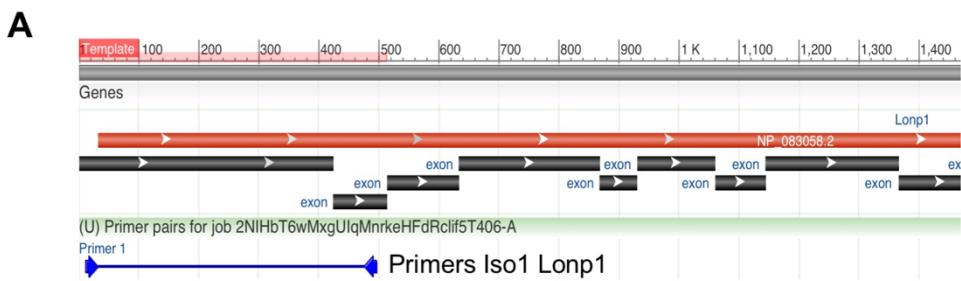


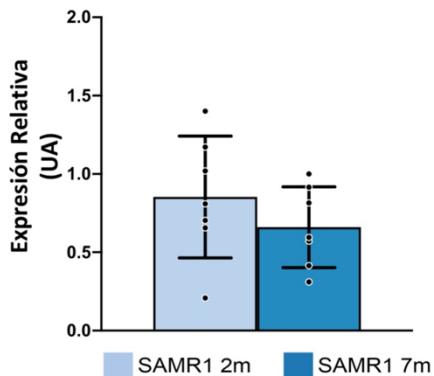
Figura 9: Disminución de los niveles de expresión y fosforilación de Mecp2 en ratones SAMP8 envejecidos. (A) Niveles proteicos de Mecp2 total, fosforilada en Serina 80 y en Serina 421 en una fracción nuclear del hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses. (B-C) Análisis densitométrico de Mecp2 total, serina 80 y serina 421, normalizada por el marcador nuclear Lamina B como control de carga y de los niveles de Mecp2 serina 80 y Serina 421 normalizados a los niveles de Mecp2 total. N= 6. Las barras representan las medias \pm SD. $p<0.05$ (*), $p < 0,01$ (**). Análisis estadístico t-student no pareada de dos colas.

6.4 Análisis de expresión de la proteasa Lonp1 en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8.

La proteasa Lonp1 en *Mus musculus* está codificada por el gen nuclear *Lonp1*, que se localiza en el cromosoma 17. Sabiendo que en ratón sólo se expresa la isoforma 1 de *Lonp1* (ver Anexo 2), se analizaron los niveles de ARNm total del hipocampo mediante RT-qPCR (Retrotranscripción-PCR tiempo real) utilizando ciclofilina A como normalizador de reacción de la RT-qPCR, ya que esta descrito que su expresión es estable, se expresa en altos niveles y presenta menor variabilidad en cerebro en comparación a otros genes normalizadores como *Gapdh* y *Actb* (Torres-Andrade et al., 2014). No observamos cambios significativos en el ARNm en los ratones SAMR1 (**Figura 10B**). En los grupos de ratones SAMP8 observamos un aumento del ARNm de *Lonp1* a los 7 meses de edad ($1.232 \pm 0,3080$) en comparación con SAMP8 adultos ($0,8993 \pm 0,2433$) (**Figura 10C**). En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento en los niveles de ARNm de *Lonp1* en ratones SAMP8 envejecidos puede ser consecuencia de los cambios de metilación del ADN de *Lonp1* y de la disminución en los niveles de proteína y/o unión de Mecp2 al promotor de *Lonp1*, aludiendo a que Mecp2 actúa como un represor transcripcional de *Lonp1*.



B Expresión *Lonp1* por RT-qPCR



C Expresión *Lonp1* por RT-qPCR

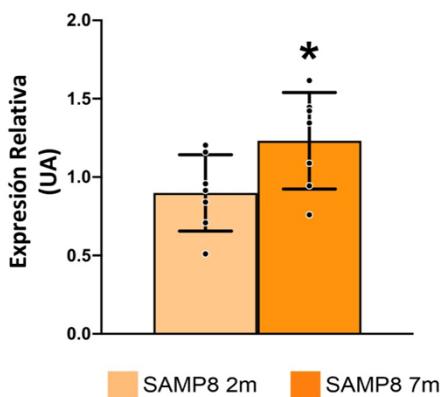


Figura 10: Niveles de expresión de *Lonp1* en hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8. (A) Mapa genético del gen *Lonp1* y alineamiento de los partidores para evaluar la expresión de *Lonp1*. (B-C) Cuantificación relativa de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses mediante RT-qPCR normalizada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando como normalizador Ciclofilina A. N= 7. En (B) las barras del gráfico representan las medias \pm SD. p<0.05 (*). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student no pareada de dos colas. En (C) Las barras del gráfico representan la medias \pm SD. p < 0.05 (*), ANOVA de 2 vía con post-test de Bonferroni.

6.5 Disminución de los niveles proteicos y actividad proteolítica de Lonp1 en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos.

En células humanas, Lonp1 presenta una distribución citoplasmática, mitocondrial, y nuclear. Lonp1 presenta una secuencia de direccionamiento a la mitocondria y otra hacia el núcleo (Zanini et al., 2022). Lonp1 es traslocada al núcleo bajo condiciones de estrés, por ejemplo, shock térmico. Evaluamos los niveles de la proteína Lonp1 en lisado total y en diferentes fracciones subcelulares del hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 meses y 7 meses. Nuestros resultados muestran una disminución significativa de los niveles de proteína Lonp1 en un lisado total de hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos (SAMP8 7 meses) (0.6879 ± 0.1843) en comparación con los ratones SAMP8 de 2 meses (1.000 ± 0.2168) (**Figura 11A y 11C**), pero a partir de este resultado no podemos determinar en qué compartimento subcelular del hipocampo está disminuido Lonp1. Por ello, posteriormente realizamos fraccionamiento subcelular, y observamos una disminución significativa de los niveles de Lonp1 sólo en la fracción enriquecida de mitocondrias en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos (0.5357 ± 0.1068) en comparación con SAMP8 2 meses (1.000 ± 0.1894) (**Figura 11A y 11C**). En los grupos de ratones SAMR1, no se observaron cambios significativos en los niveles de proteína de Lonp1 (**Figura 11A y 11B**). Sorpresivamente, estos resultados no se condicen con lo observado en el análisis de transcripto de *Lonp1*, ya que mientras los niveles de mRNA de *Lonp1* están aumentados en el envejecimiento, los niveles proteicos se reducen en la mitocondria; lo que podría explicarse por cambios post-traduccionales que controlan la actividad/estabilidad de la proteasa (Wu et al., 2023; Gibellini et al., 2014; Hoshino et al., 2014;). Así, esta disminución de Lonp1 puede promover una pérdida de la homeostasis proteica mitocondrial de acuerdo con lo reportado en los estudios de la disminución de los niveles de proteína de LONP1 en células humanas (KD-Lonp1) (Zurita Rendon & Shoubridge, 2018).

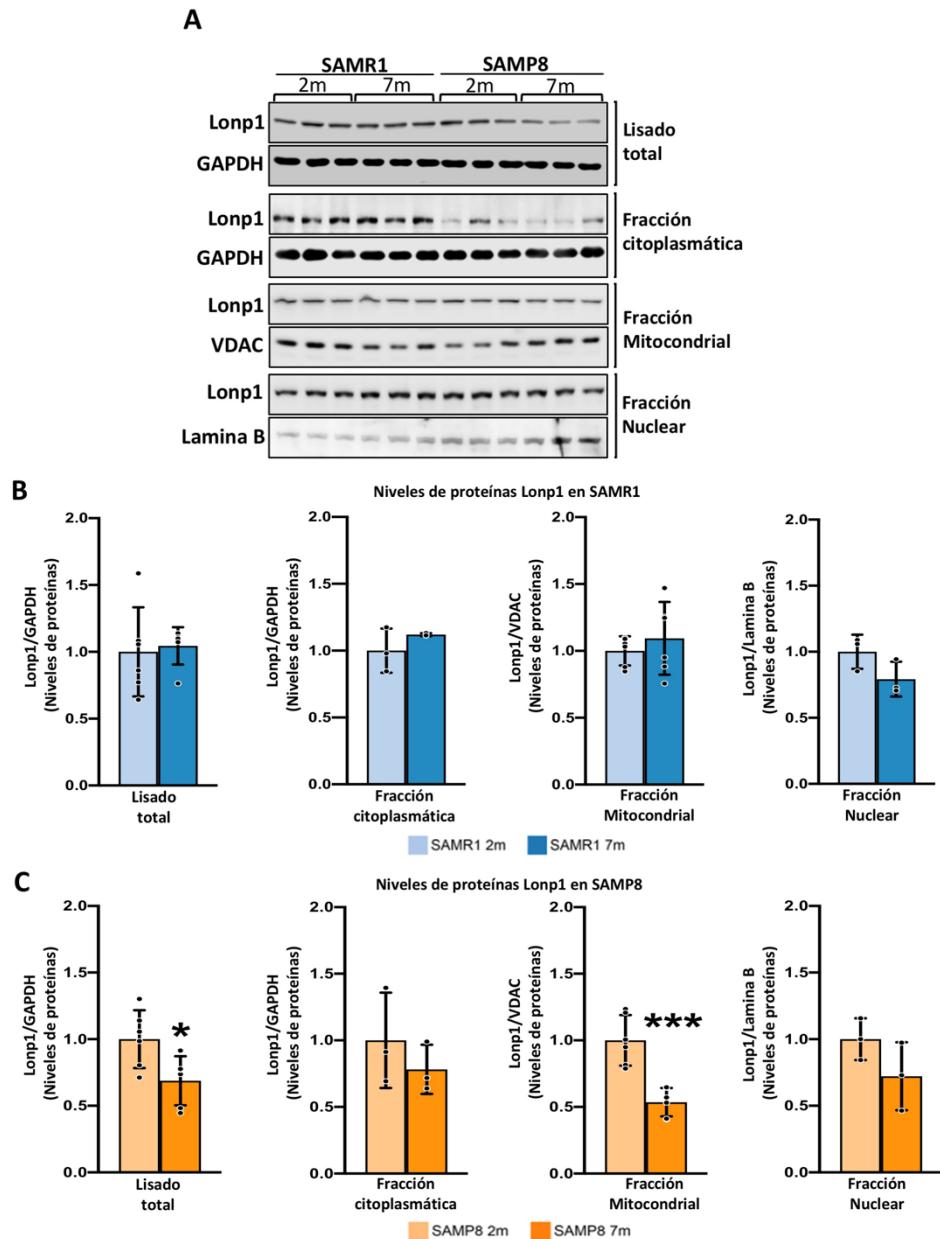


Figura 11: Disminución de los niveles proteicos de Lonp1 en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos. (A) Western Blot contra Lonp1 en un lisado total, fracción citoplasmática, fracción enriquecida de mitocondrias y fracción nuclear del hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses. (B) Análisis densitométrico de Lonp1 en diferentes fracciones subcelulares del hipocampo de ratones SAMR1 de 2 y 7 meses, normalizada por la expresión de los controles de carga: Lisado total y citoplasma (GAPDH); Mitocondria (VDAC) y Nuclear (Lamina B). (C) Análisis densitométrico de los niveles de Lonp1 en el hipocampo de ratones SAMP8 de 2 y 7 meses, normalizada por su respectivo control de carga. N = 3 para las fracciones citoplasmática y nuclear. N = 6 para lisado total y la fracción enriquecida de mitocondrias. Las barras del gráfico representan las medias \pm SD. p<0.05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***)

Posteriormente, medimos la actividad proteolítica de Lonp1 utilizando un sustrato fluorogénico de caseína, FITC-Caseína (Lee et al., 2022), ya que α -caseína es un sustrato reportado de Lonp1 en la mitocondria (He et al., 2018). FITC-Caseína se utiliza para medir la actividad proteolítica de las proteasas tipo tripsina, incluida Lonp1 (Lee et al., 2022). La actividad proteasa se evidenció porque FITC-Caseína emite fluorescencia al ser proteolizada. Estandarizamos el kit FITC-Caseína utilizando distintas cantidades de tripsina recombinante (5-10-15-20-25 ng) (**Figura 12A**). Mediante inmunoprecipitación, obtuvimos la proteasa Lonp1 desde un lisado total de hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses (**Figura 12B**) y realizamos una cinética de 60 minutos, con lecturas cada 15 segundos en un lector de fluorescencia en placa de 96 pocillos. Las gráficas de cinética se observan en la **figura 12**. Los parámetros cinéticos se detallan en la **tabla 7**. Observamos que el área bajo la curva de la cinética de degradación del FITC-Caseína durante 60 minutos en los ratones SAMP8 envejecidos ($62,79 \pm 0.02572$) es menor que en ratones SAMP8 2 meses ($63,37 \pm 0.02111$). En los ratones SAMR1 7 meses ($64,12 \pm 0.03971$) es menor a los grupos de ratones SAMR1 2 meses ($64,38 \pm 0.07305$) (**Figura 12C**). Además, la cinética de degradación de los ratones SAMR1 de 2 y 7 meses es significativamente distinta ($p=0.0479$), mismo efecto observado en ratones SAMP8 de 2 y 7 meses ($p=0.017$). A partir de esta cinética evaluamos la velocidad inicial de proteólisis (V_0), que se midió desde 0 a 5 minutos (fase lineal de la curva). Observamos que Lonp1 de SAMP8 de 2 meses ($V_0: 0,004559$ mg proteólisis (FITC) / 5min) presenta mayor capacidad de proteólisis inicial en comparación con la proteasa de SAMP8 envejecidos ($V_0: 0,003668$ proteólisis (FITC) / 5min) (**Figura 12D**). En los grupos SAMR1, Lonp1 de SAMR1 de 2 meses ($V_0: 0,006250$ mg proteólisis (FITC) / 5min) presenta mayor capacidad de proteólisis en comparación con Lonp1 de SAMR1 de 7 meses ($V_0: 0,005346$ proteólisis (FITC) / 5min) (**Figura 12D**). Luego, evaluamos la capacidad de proteólisis a distintos tiempos (10-15-30-60 minutos), para evaluar la saturación enzimática de Lonp1. En los grupos SAMR1 no observamos diferencias significativas en los tiempos evaluados (**Figura 12E**), lo que nos sugiere que la Lonp1 endógena obtenida de ratones SAMR1 de 2 meses y 7 meses de edad proteóliza la misma cantidad de

FITC-Caseína a los 60 minutos de cinética de degradación (ambas curvas se solapan a tiempo final). En ratones SAMP8 observamos diferencias significativas a los 30 y 60 minutos de la cinética de degradación. La actividad proteolítica de Lonp1 disminuye en el ratón SAMP8 envejecido en comparación con la proteasa de ratones SAMP8 de 2 meses a los 30 y 60 min de la cinética de degradación (**Figura 12F**). En conjunto, estos resultados indican una menor capacidad proteolítica de la proteasa Lonp1 en ratones SAMP8 envejecidos en comparación con SAMP8 2 meses. Interesantemente, la actividad proteolítica de Lonp1 también difiere entre ratones SAMR1 de 2 y 7 meses de edad, pero en menor medida que en los SAMP8, lo que nos sugiere que en el tiempo la actividad proteolítica de Lonp1 disminuye, incluso previo al proceso de envejecimiento, posiblemente por modificaciones post-traduccionales como las oxidaciones (Hoshino et al., 2014) y acetilaciones (Wu et al., 2023; Gibellini et al., 2014), las cuales se ha reportado que disminuyen la actividad enzimática de Lonp1.

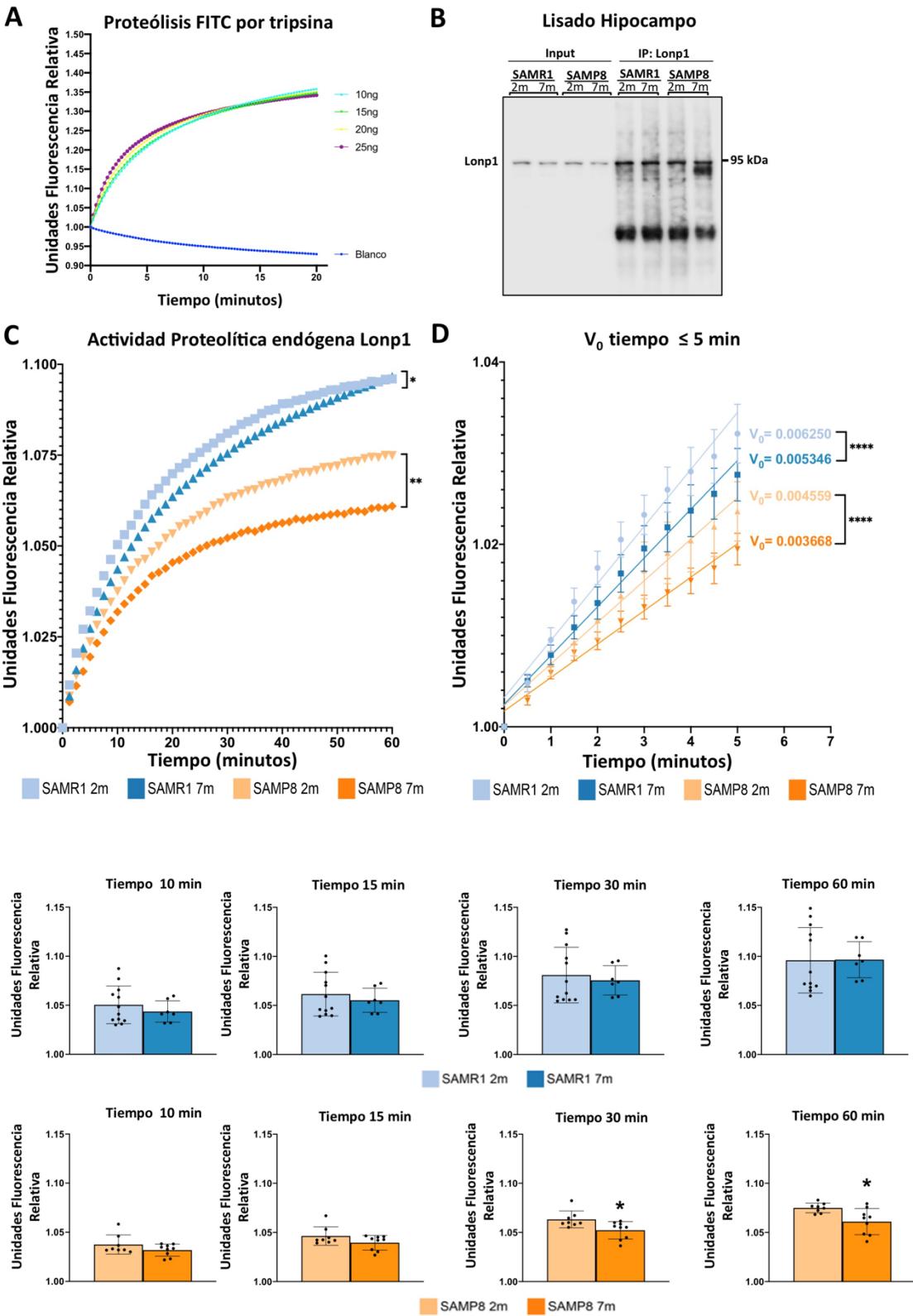


Figura 12: Caracterización de la actividad proteolítica de Lonp1 del hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses. (A) Estandarización en ensayo de FITC-caseína usando tripsina recombinante. (B) Western Blot de los ensayos de inmunoprecipitación de Lonp1 extraída desde el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses para los ensayos de FITC-caseína. (C) Ensayo de actividad proteolítica de Lonp1 inmunoprecipitada del hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses, utilizando FITC-caseína durante 60 minutos. (D) Velocidad inicial (V_o) de proteólisis de Lonp1, y (E) capacidad proteolítica de Lonp1 a los 10, 15, 30 y 60 minutos. N = 3 para análisis de Western Blot. N = 12 (SAMR1 2m), N = 7 (SAMR1 7m), N = 8 (SAMP8 2m) y N = 9 (SAMP8 7m) para FITC-Caseína. Los graficos de cinética de degradación de 60 minutos y V_o muestran las medias ± SD. p<0.05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***) y p<0,0001 (****), ANOVA de 2 vías con post-test de Bonferroni. Para los gráficos de los tiempos de 10-15-30-60 minutos, las barras representan las medias ± SD. p<0.05 (*), t-student no pareada de dos colas.

Tabla 7: Parámetros de Lonp1 endógena obtenidas de la cinética de degradación del FITC-Caseína.

| Linea | Edad | Área bajo la curva | V_0 (RFU/time) | t=10 min (RFU/10 min) | t=15 min (RFU/15 min) | t=30 min (RFU/30 min) | t=60 min (RFU/60 min) |
|-------|------|--------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SAMR1 | 2m | (64,38 ± 0.07305) | 0,006250 | 1,050 ± 0.01924 | 1,062 ± 0.02224 | 1,081 ± 0.02835 | 1,096 ± 0.03335 |
| SAMR1 | 7m | (64,12 ± 0.03971) | 0,005346 (****) | 1,044 ± 0.01088 | 1,055 ± 0.01232 | 1,076 ± 0.01494 | 1,097 ± 0.01834 |
| SAMP8 | 2m | (63,37 ± 0.02111) | 0,004559 | 1,037 ± 0.009788 | 1,046 ± 0.009381 | 1,063 ± 0.008570 | 1,075 ± 0.004923 |
| SAMP8 | 7m | (62,79 ± 0.02572) | 0,003668 (****) | 1,032 ± 0.006148 | 1,039 ± 0.007447 | 1,052 ± 0.008865 (*) | 1,061 ± 0.01326 (*) |

(*) p<0.05 y (****) p<0.0001, con respecto a la colonia SAM correspondiente de 2m.

6.6 Acumulación de proteínas anómalas y sustratos de Lonp1 en mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos.

En el envejecimiento los mecanismos de proteostasis en la célula reducen su función, induciendo la acumulación de proteínas anómalas (Hipp et al., 2019; Lopez-Otin et al., 2023). Considerando esto, evaluamos si los ratones SAMP8 envejecidos presentan acumulación de proteínas mal plegadas en el hipocampo mediante la sonda fluorogénica TPE-MI, que se une a los grupos tioles libres de las cisteínas de las proteínas desplegadas (Chen et al., 2017). Observamos acumulación de proteínas mal plegadas en ratones SAMP8 envejecidos ($1,638 \pm 0.1466$) en una fracción citoplasmática en comparación con los ratones SAMP8 2 meses ($1,000 \pm 0.1015$). Mismo efecto observamos en una fracción enriquecida de mitocondrias en ratones SAMP8 envejecidos ($1,447 \pm 0.1309$) en comparación con ratones SAMP8 2 meses ($1,000 \pm 0.0918$) (**Figura 13A**). No observamos diferencias significativas entre los grupos de ratones SAMR1 en la fracción citoplasmática y mitocondrial (**Figura 13A**). Además, evaluamos los niveles proteicos del factor A de transcripción mitocondrial (TFAM), caseína (Lu et al., 2013) y HMGCS2 (Bai et al., 2023) sustratos reportados de la proteasa Lonp1. Observamos un aumento significativo en los niveles de TFAM en una fracción enriquecida de mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos ($1,157 \pm 0.0718$) en comparación con ratones SAMP8 de 2 meses ($1,000 \pm 0.0323$) (**Figura 13B y 13C**). Interesantemente, HMGCS2 aumenta en ratones SAMR1 de 7 meses ($1,357 \pm 0.1672$) en comparación a ratones SAMR1 de 2 meses ($1,000 \pm 0.0625$), al igual que TFAM (SAMR1 7 meses: $1,871 \pm 0.0300$; SAMR1 2 meses: $1,000 \pm 0.3587$). El aumento en los sustratos de Lonp1 en SAMR1 podrían explicarse por los cambios en la actividad de la proteasa en los SAMR1 de 7 meses, donde se observa que Lonp1 presenta un comportamiento cinético diferente, con una V_o menor (**Figura 12**). En conjunto, los resultados indican que la acumulación de proteínas anómalas es producto de una reducida actividad de los mecanismos de proteostasis, característico en el hipocampo de ratones envejecidos; pero, además, los cambios en la actividad proteolítica de Lonp1 podría estar asociado a la edad, pero podría ser un evento que comienza previo al envejecimiento.

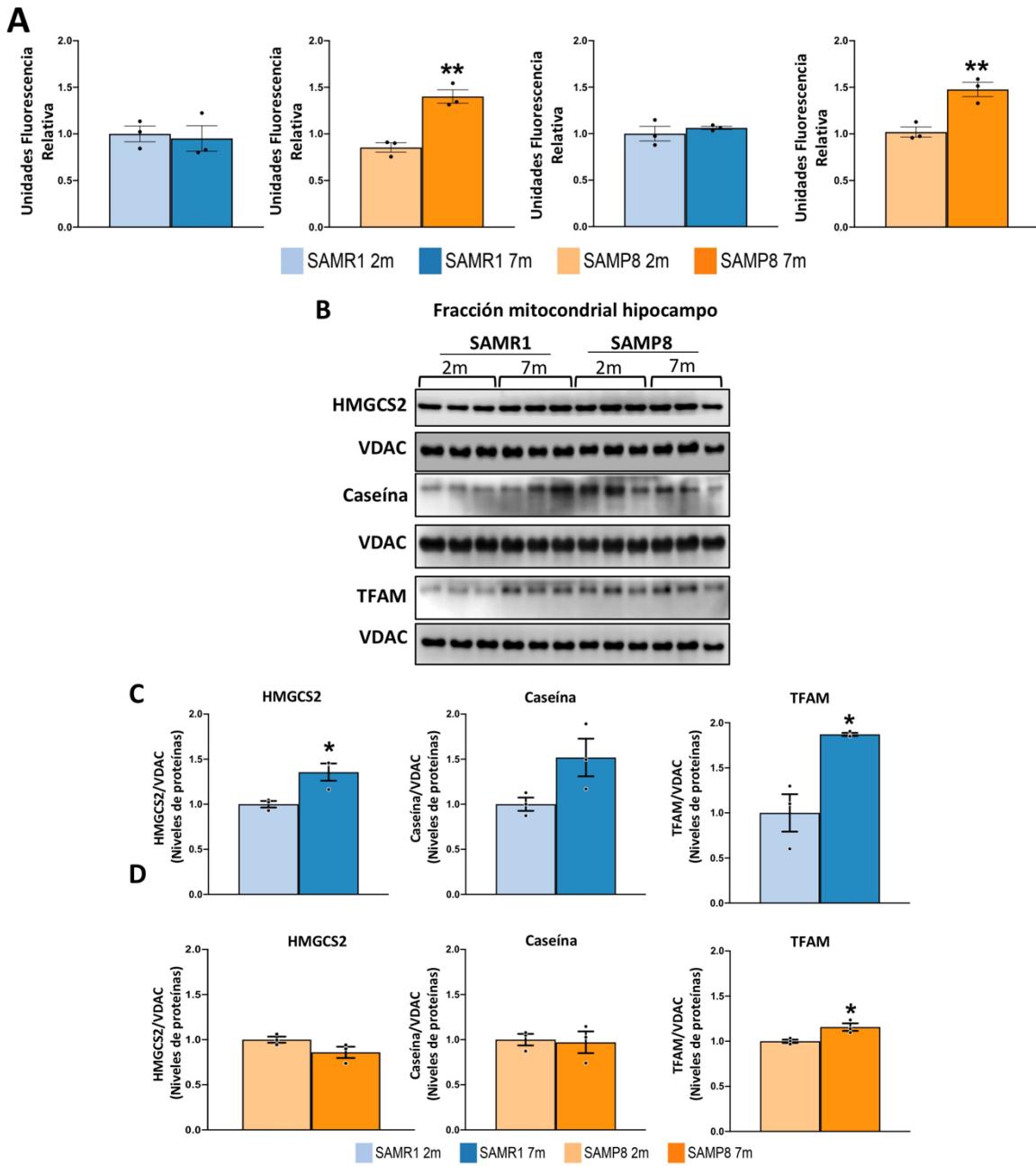


Figura 13: Acumulación de proteínas mal plegadas y sustratos de Lonp1 en ratones SAMR1 y SAMP8 de 7 meses. (A) Niveles de proteínas mal plegadas en una fracción citoplasmática libre de mitocondrias y una fracción enriquecida de mitocondrias del hipocampo, utilizando la sonda fluorescente TPE-MI. (B) Western Blot de sustratos de Lonp1; HMGCS2, TFAM y Caseína en una fracción enriquecida de mitocondrias del hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2m y 7m. (C) Análisis densitométrico de los niveles proteicos de HMGCS2, TFAM y Caseína normalizada por la expresión de VDAC como control de carga mitocondrial. N=3. Las barras del gráfico representan las medias \pm SD. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), prueba t-student no pareada de dos colas.

6.7 Acumulación de Tau PHF-1 en mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos.

Estudios de nuestro laboratorio reportaron que la proteína Tau PHF-1 se acumula al interior de mitocondrias sinápticas en el hipocampo de ratones C57BL/6 envejecidos (18 meses), y que esto se correlaciona con la disfunción mitocondrial sináptica que contribuye en parte a la pérdida de memoria en el envejecimiento (Olesen et al., 2020; Torres et al., 2021). Sin embargo, se desconoce si es esta proteína la que promueve, al menos en parte, la disfunción mitocondrial. Considerando estos antecedentes, evaluamos los niveles proteicos de Tau PHF-1 en el hipocampo de nuestros 4 grupos de ratones experimentales, y observamos que la proteína Tau PHF-1 se acumula en un lisado total del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos ($1,390 \pm 0.1967$) en comparación con ratones SAMP8 de 2 meses ($1,000 \pm 0.0995$) y en una fracción enriquecida de mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos ($1,963 \pm 0.3147$) en comparación con ratones SAMP8 de 2 meses ($1,000 \pm 0.0679$) (**Figura 14A y 14B**), coincidente con lo reportado en los estudios de nuestro laboratorio en otra cepa de ratones envejecidos. Una posible explicación de la acumulación de Tau PHF-1 en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos, podrían ser los menores niveles de proteínas de Lonp1, sumado a la menor capacidad de proteólisis, lo que nos sugiere que Tau PHF-1 podría ser un posible sustrato de Lonp1. Esto además se sustenta en estudios reportados en los cuales se demuestra que Lonp1 proteoliza proteínas citoplasmáticas sustratos del proteasoma cuando este se encuentra inhibido; ya que Tau es sustrato de degradación proteasomal y el proteasoma reduce su función en el envejecimiento (Keller et al., 2000).

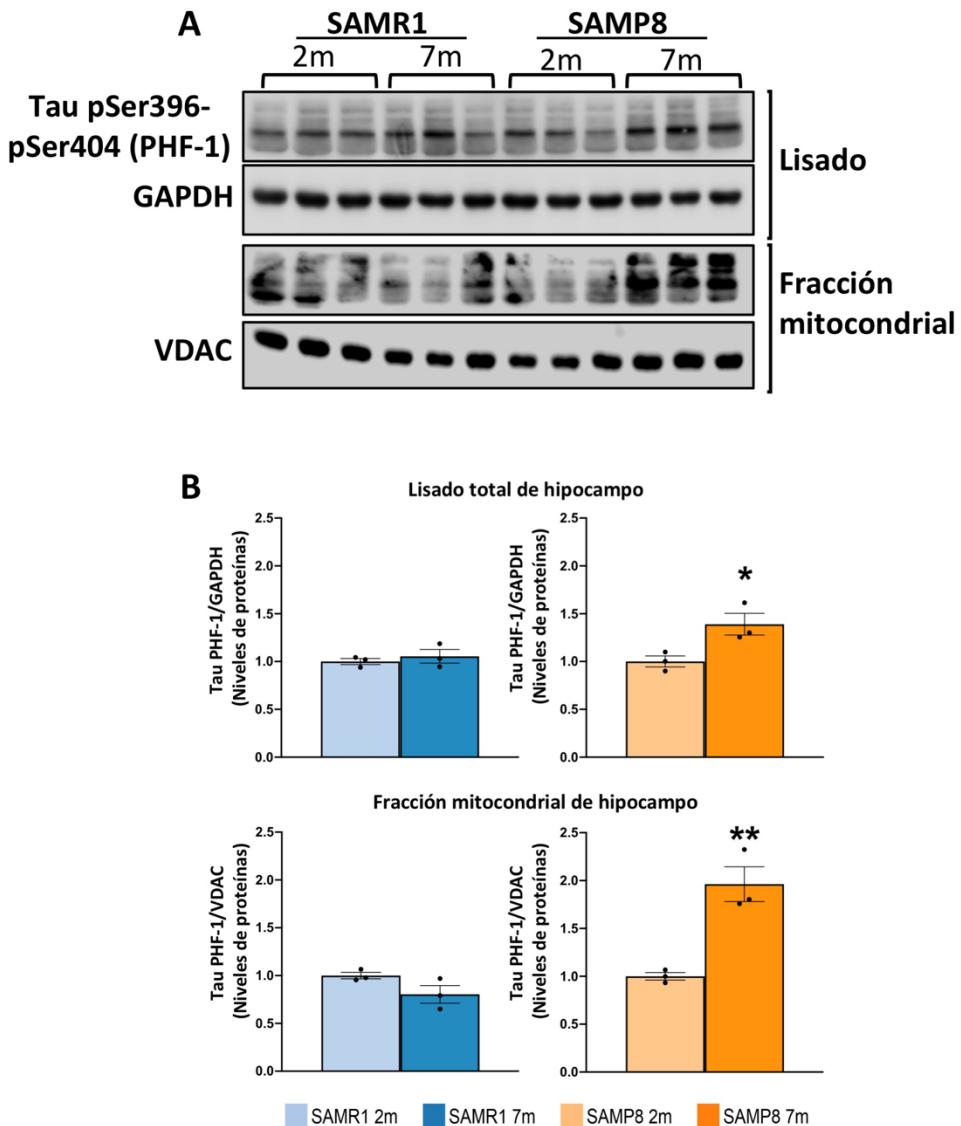


Figura 14: Tau PHF-1 aumenta en hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos.
 (A) Western Blot de Tau PHF-1 en un lisado total y una fracción enriquecida de mitocondrias del hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses. (B) Análisis densitométrico de los niveles de Tau PHF-1 normalizada por la expresión de GAPDH para lisado total y VDAC para la fracción mitocondrial. N=3. Las barras del gráfico representan las medias \pm SD. $p<0.05$ (*), $p < 0,01$ (**). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student no pareada de dos colas.

6.8 Tau fosforilada en Ser396 y Ser404 (PHF-1) se acumula en la mitocondria cuando se inhibe a la proteasa mitocondrial Lonp1.

Antecedentes en células humanas han mostrado una ruta de asistencia a la degradación de proteínas citoplasmáticas mediada por la mitocondria, siendo la proteasa Lonp1 encargada de degradar estos sustratos proteicos (Li et al., 2019; Wang et al., 2019). Tau PHF-1 se acumula al interior de las mitocondrias hipocampales, y hasta ahora no sabemos si se destina a la mitocondria para ser degradada por Lonp1. Para evaluar esto, realizamos estudios de inhibición de la actividad proteolítica de Lonp1, usando: CDDO-me (2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9 (11)-dien-28-ácido oico-metil), inhibidor reversible no competitivo que bloquea la hidrolisis de ATP y por ende su actividad proteolítica (Lee et al., 2022); y Sesamin, inhibidor competitivo que se une a la serina (Ser855) y lisina (Lys898) catalíticas (Wang et al., 2010). Realizamos tratamientos *ex vivo* en rebanadas de hipocampo de ratones SAMR1 de 2 meses con CDDO-me ($6 \mu\text{M}$; IC₅₀ $3,20 \mu\text{M}$) y Sesamin ($40 \mu\text{M}$; IC₅₀ $19,99 \mu\text{M}$) por 5 horas. Finalizado el tratamiento, se aisló la fracción enriquecida de mitocondria y se midieron los niveles de sustratos conocidos de Lonp1 y Tau PHF-1. Por último, evaluamos el efecto de la inhibición de Lonp1 sobre la función mitocondrial. Observamos un aumento significativo de los niveles de TFAM, al inhibir con CDDO-me ($1,372 \pm 0.3076$) y con Sesamin ($1,500 \pm 0.1699$) con respecto al control ($1,000 \pm 0.0368$). Mismo efecto se observó con caseína (control: 0.8087 ± 0.2734 ; CDDO-me: $1,229 \pm 0.2400$; Sesamin: $1,317 \pm 0.2530$) (**Figura 15A y 15B**). Además, observamos que los tratamientos con ambos inhibidores no afectan los niveles de proteína de Lonp1 (**Figura 15A y 15B**), lo que nos indica que la inhibición proteolítica de Lonp1 fue efectiva. Además, observamos que los niveles de la proteína Tau PHF-1 aumentan significativamente con ambos inhibidores de Lonp1 (control: $1,000 \pm 0.1722$; CDDO-me: $1,836 \pm 0.6377$; Sesamin: $1,683 \pm 0.5291$) (**Figura 15C y 15D**). Estos resultados indican que al inhibir la actividad proteolítica de Lonp1 se acumula Tau PHF-1 en la fracción enriquecida de mitocondrias, lo que nos sugiere que Tau PHF-1 es un potencial sustrato de Lonp1.

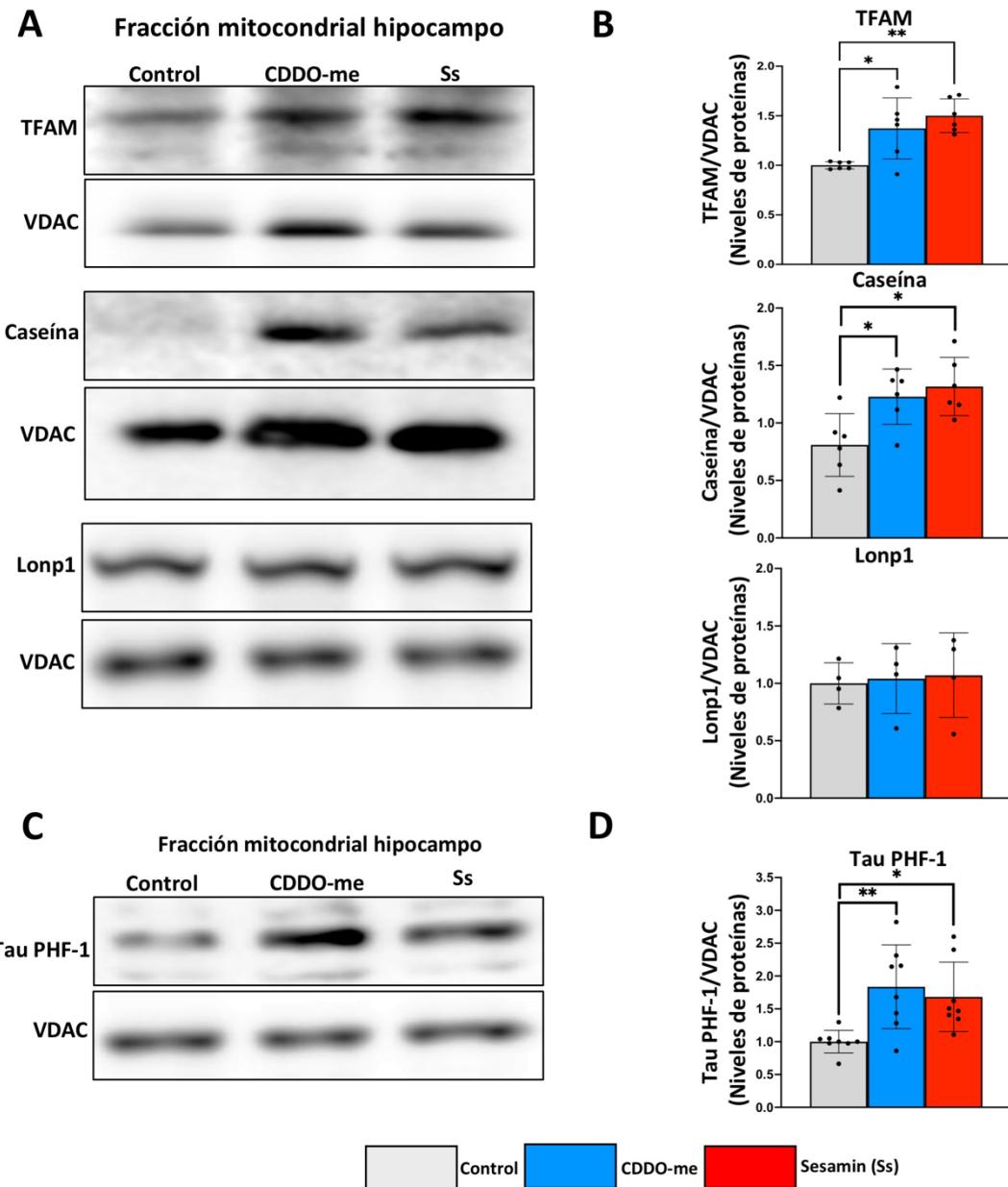


Figura 15: La proteína Tau fosforilada en Ser396 y Ser404 (PHF-1) como potencial sustrato de la proteasa mitocondrial Lonp1. Tratamientos ex-vivo de rebanadas del hipocampo de ratones SAMR1 de dos meses tratados con 2 inhibidores farmacológicos de Lonp1, CDDO-me (6 μ M) y Sesamin (40 μ M) durante 5 horas. Finalizado el tratamiento, se aisló una fracción enriquecida de mitocondrias. (A) Western Blot de sustratos de Lonp1: TFAM y Caseína. (B) Análisis densitométrico de los niveles de proteínas, normalizada por la expresión de VDAC como control de carga. (C) Western Blot de Tau PHF-1 y su (D) Análisis densitométrico utilizando VDAC como control de carga. N = 4 tratamientos (1 animal por tratamiento). Las barras del gráfico representan las medias \pm SD. p<0,05 (*); p<0,01 (**). ANOVA de una vía con post test Bonferroni.

Finalmente, evaluamos el efecto de la inhibición de la actividad proteolítica de Lonp1 con ambos inhibidores farmacológicos y la consecuente acumulación de Tau PHF1 sobre la función mitocondrial. La mitocondria es el principal productor de ROS en la célula, produciendo anión superóxido (O_2^-), generados por la fuga de electrones de los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones (CTE), esto se midió utilizando la sonda fluorescente MitoSox. Además, medimos el consumo de oxígeno, que evalúa la actividad del complejo IV de la CTE mediante una sonda fluorescente, cuya fluorescencia es proporcional al consumo de oxígeno por la mitocondria. La producción de ATP se midió con un kit de bioluminiscencia que detecta la producción de ATP de la enzima ATPasa del complejo V de la CTE. Al Finalizar el tratamiento *ex-vivo* con ambos inhibidores, obtuvimos una fracción enriquecida de mitocondrias y esta se incubó con los sustratos oxidativos piruvato y malato, por 30 minutos. Luego medimos los parámetros de ROS, consumo de oxígeno y ATP en un lector de placas de 96 pocillos. Observamos que el tratamiento con los inhibidores de Lonp1 (CDDO-me: $1,229 \pm 0.1186$ y Sesamin: $1,213 \pm 0.0069$) aumenta los niveles de ROS con respecto al control ($1,000 \pm 0.1160$) (**Figura 16A**). De igual manera, frente a la inhibición de Lonp1 se reducen los niveles de consumo de oxígeno (control: $1,000 \pm 0.0183$; CDDO-me: $0,7813 \pm 0.0756$; Sesamin: $0,7210 \pm 0.0423$) (**Figura 16B**) y los niveles de ATP producidos por una fracción enriquecida de mitocondria aislada del hipocampo de ratones SAMR1 adultos (control: $1,000 \pm 0.09876$; CDDO-me: 0.5701 ± 0.2344 ; Sesamin: 0.6666 ± 0.0635) (**Figura 16C**). Estos resultados sugieren que al inhibir la actividad proteolítica de Lonp1 se induce disfunción en las mitocondrias del hipocampo, efecto similar a lo observado en el proceso de envejecimiento. Esto podría ser debido, al menos en parte, a la acumulación de Tau PHF-1 en la mitocondria.

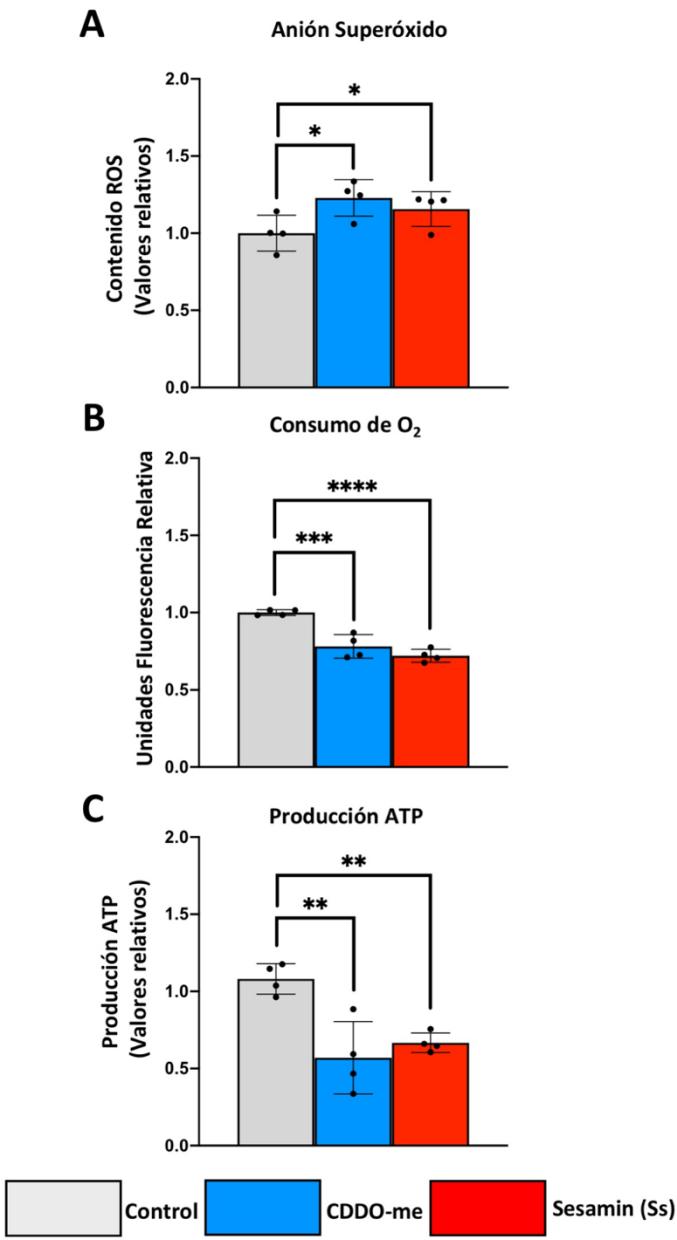


Figura 16: Efecto de la inhibición de la actividad proteolítica de Lonp1 sobre la función bioenergética mitocondrial. Tratamiento ex-vivo de rebanadas del hipocampo de ratones SAMR1 de 2 meses tratados con 2 inhibidores farmacológicos de Lonp1, CDDO-me (6 μ M) y Sesamin (40 μ M) durante 5 horas. Finalizado el tratamiento, se aisló una fracción enriquecida de mitocondrias y se analizó la funcionalidad de estas mitocondrias, mediante: (A) producción de ROS (anión superóxido (O_2^-)); (B) consumo de O_2 , y (C) producción de ATP tras la exposición a sustratos oxidativos durante 30 minutos. N = 4 tratamientos (1 animal por tratamiento). Las barras del gráfico representan las medias \pm SD. p<0,05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***); p<0,0001 (****), ANOVA de una vía con post test Bonferroni.

6.9 Tau PHF-1 es un nuevo sustrato de la proteasa Lonp1.

Para evaluar si Tau PHF-1 es un sustrato de Lonp1 realizamos ensayos de degradación *in vitro* (Bezawork-Geleta et al., 2015; Gur & Sauer, 2008). Para ello, inmunoprecipitamos Lonp1 y Tau PHF-1 y verificamos que la proteasa Lonp1 inmunoprecipitada presenta actividad proteolítica mediante los estudios de FITC-Caseína. Para el ensayo de degradación *in vitro*, se incubaron Lonp1 y Tau PHF-1 inmunoprecipitadas por 1, 2, o 4 horas en una solución de actividad conteniendo ATP, ya que Lonp1 es una proteasa AAA+ que necesita de ATP para ejercer su función proteolítica (Gibellini et al., 2020; Zhang & Mao, 2020). Además, utilizamos los siguientes controles: i) inhibidor de la degradación (CDDO-me) y control positivo de degradación (activador de Lonp1 84B10, (Bai et al., 2023)). Finalizados los tiempos de los ensayos de degradación *in vitro*, verificamos por ensayos de Western Blot si Tau PHF-1 es degradado por Lonp1. Mediante análisis de Western Blot observamos que la señal de densitometría de la proteína Tau PHF-1 disminuye en el tiempo, a partir de la hora 1 la señal de densitometría disminuye en un ($71,38 \pm 4.981\%$), y a los tiempos de 2 y 4 horas disminuye la señal de densitometría alrededor del ($85, 88 \pm 11,140\%$) con respecto al tiempo 0 (**Figura 17A y 17B**). Además, corroboramos la actividad ATPasa de Lonp1 por el consumo de ATP del ensayo, y observamos un aumento del consumo de ATP conforme aumenta el tiempo de degradación (**Figura 17C**). Finalmente, evaluamos la capacidad de proteólisis de la proteasa Lonp1 por ensayos de degradación *in vitro*. Obtuvimos por inmunoprecipitación Lonp1 endógena de ratones SAMP8 de 2 y 7 meses. Confirmamos que la proteasa Lonp1 obtenida del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos presenta menor capacidad proteolítica de la proteína Tau PHF-1 en comparación con ratones SAMP8 de 2 meses (**Figura 17D**). El resultado de este ensayo de degradación *in vitro*, demuestra que la proteína Tau PHF-1 es un nuevo sustrato de degradación de la proteasa mitocondrial Lonp1. Estudios complementarios de bioinformática identifican motivos de proteólisis de Lonp1 en la secuencia de Tau PHF-1 (Anexo 4).

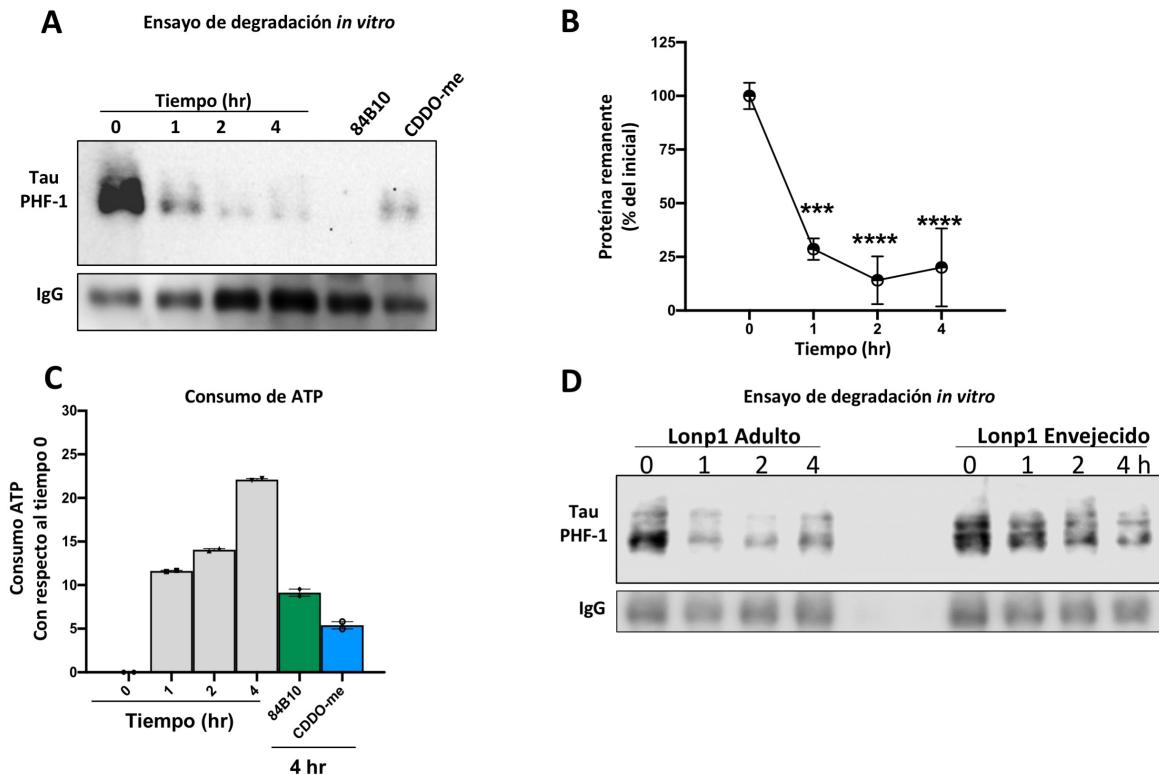


Figura 17: Tau PHF-1 es un nuevo sustrato de la proteasa mitocondrial Lonp1.

(A) Western Blot para Tau PHF-1 normalizada por la expresión de IgG como control de carga del ensayo de degradación *in vitro*: incubación de Lonp1 y Tau PHF-1 obtenidas por inmunoprecipitación desde el hipocampo de ratones SAMP8 de 4 meses. Controles del ensayo *in vitro*, activador de Lonp1 84B10 (5 µM) y el inhibidor de Lonp1 CDDO-me (6 µM), ambos incubados por 4 horas. (B) Análisis densitométrico de los niveles Tau PHF-1 del Western Blot mostrado en A. (C) Medición del consumo de ATP del ensayo de degradación *in vitro*. (D) Western Blot para Tau PHF-1 desde el ensayo de degradación *in vitro*; incubación de la proteasa Lonp1 obtenidas por inmunoprecipitación del hipocampo de ratones SAMP8 de 2 y 7 meses de edad, incubada con Tau PHF-1 inmunoprecipitada de ratones SAMP8 de 7 meses. N = 3 . El gráfico en B representa las medias ± SD. p<0,05 (*); p<0,01 (**); p<0,001 (***) ; p<0,0001 (****), ANOVA de una vía con post test Bonferroni.

6.10 La acumulación de la proteína Tau PHF-1 en la mitocondria induce disfunción mitocondrial.

Estudios han reportado que la pseudo-fosforilación de Tau PHF-1 induce disfunción mitocondrial *in vitro*, en cultivos primarios de neuronas corticales maduras (14 DIV), afectando el potencial de membrana mitocondrial y aumentando el estrés oxidativo. Sin embargo, se desconocen los mecanismos involucrados (Quintanilla et al., 2014). Por el contrario, estudios en ratones indican que la delección de Tau mejora la función mitocondrial y las capacidades cognitivas en el hipocampo de animales adultos y reduce el deterioro cognitivo y mitocondrial durante el envejecimiento (Jara et al., 2018; Jara et al., 2020). Para determinar si Tau PHF1 induce disfunción mitocondrial directamente, realizamos un fraccionamiento celular para obtener citoplasma libre de mitocondria (ya que la mayor cantidad de tau PHF-1 se acumula en el citoplasma) y una fracción enriquecida de mitocondrias. Incubamos una fracción enriquecida de mitocondrias obtenida de ratones SAMP8 de 2 meses con: i) el citoplasma de ratones SAMP8 de 2 meses; ii) el citoplasma de ratones SAMP8 de 7 meses; o iii) con la proteína Tau recombinante fosforilada en serina 396 (tau pSer396); por 1 hora a 37°C. Finalizado la incubación, obtuvimos las mitocondrias y realizamos western blot de Tau PHF-1, Tau total y VDAC como control de carga mitocondrial. Observamos que Tau PHF-1 se acumula en la mitocondria, y que esta acumulación es mayor cuando las mitocondrias son expuestas al citoplasma de ratones SAMP8 envejecidos (**Figura 18A**). Además, evaluamos la producción de ATP de estas mitocondrias mediante un kit de bioluminiscencia, y observamos una disminución en la producción de ATP de las mitocondrias de ratones SAMP8 de 2 meses incubadas con el citoplasma de ratones SAMP8 envejecidos (0.3237 ± 0.0753) en comparación con mitocondrias de ratones SAMP8 de 2 meses incubadas con el citoplasma de ratones SAMP8 de 2 meses ($1,000 \pm 0.2461$) (**Figura 18B**). Mismo efecto observamos en las mitocondrias incubadas con la proteína Tau recombinante fosforilada en Ser396 ($63,48 \pm 23,99$) con respecto al control ($100 \pm 21,40$) (**Figura 18C**). Estos resultados indican que la acumulación de Tau PHF-1 en la mitocondria induce una pérdida de la función bioenergética de la mitocondria.

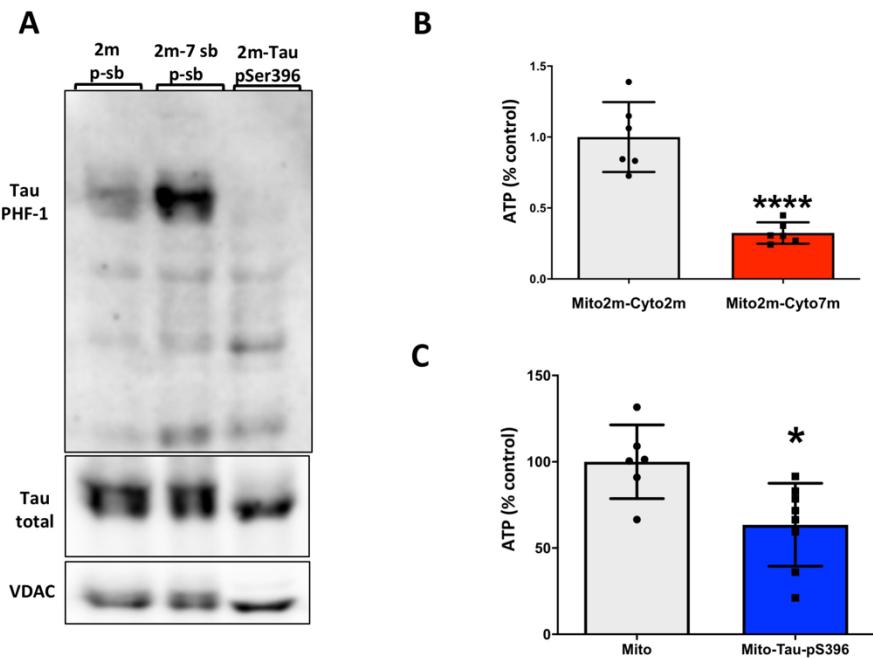


Figura 18: Ensayo de importe mitocondrial *in vitro* en mitocondrias de ratones SAMP8 de 2 meses de edad. Fracción enriquecida en mitocondrias (p) de hipocampo de ratones de 2 meses incubadas con una fracción citoplasmática libre de mitocondria (sobrenadante, sb) obtenida del hipocampo de ratones SAMP8 de 2 o 7 meses por 30 minutos a 37°C. Luego de la incubación, las mitocondrias fueron evaluadas mediante Western Blot o incubadas en buffer de respiración más sustratos oxidativos por 30 minutos a 37°C para medir producción de ATP. **(A)** Western Blot para medir los niveles proteicos de Tau PHF-1 y Tau total en una fracción enriquecida de mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 de 2 meses; VDAC como marcador mitocondrial. **(B)** Producción de ATP de mitocondrias expuestas a sustratos oxidativos. **(C)** mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 de 2 meses tratadas con 500 pg/mL de Tau pSer396 recombinante. N=6. Las barras del gráfico representan las medias \pm SD. p<0.05 (*) y p<0,0001 (****). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-student no pareada de dos colas.

En resumen, nuestros resultados muestran, por primera vez, cambios de metilación globales del promotor de *Lonp1* en el hipocampo de ratones envejecidos. Además, describimos que el lector epigenético Mecp2 regula transcripcionalmente a *Lonp1*, y una menor unión y fosforilación en Serina 80 de Mecp2 podría promover un aumento del transcripto de *Lonp1*, sugiriendo que Mecp2 actúa como un represor transcripcional de *Lonp1*. Sumado a ello, y contrario a lo esperado en relación con el aumento del mRNA de *Lonp1*, nuestros resultados indican que los niveles proteicos de Lonp1 y su actividad proteolítica disminuye en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos. Sorpresivamente los ratones SAMR1 de 7 meses, que corresponden a ratones adultos no envejecidos también presentan disminución en la actividad protelítica de Lonp1. Por lo que probablemente los niveles proteicos de Lonp1 están regulados de manera post-traduccional, alterando la estabilidad de la proteína y favoreciendo su degradación, y la disminución de la actividad proteolítica de Lonp1 también esté influenciada por modificaciones post-traduccionales que serían previas al proceso de envejecimiento. Por ultimo, se evidencia la función que ejerce Lonp1 en la degradación de Tau PHF-1, ya que la inhibición de Lonp1 favorece la acumulación de esta forma modificada de tau y los ensayos de degradación *in vitro* validan a Tau PHF-1 como un nuevo sustrato de Lonp1, el que, al acumularse en la mitocondria induce disfunción bioenergética mitocondrial.

7. Discusión

En esta tesis de doctorado, estudiamos la regulación epigenética, niveles de proteínas y actividad de la proteasa Lonp1 y sus cambios en el envejecimiento, y si los cambios en Lonp1 en el hipocampo envejecido se asocia a la acumulación de Tau PHF-1 en el interior de las mitocondrias. Es importante destacar que se ha descrito una forma de regulación transcripcional de *LONP1* mediante la metilación del ADN en zonas reguladoras de *LONP1* en células humanas. Nos enfocamos en comprender las alteraciones a nivel molecular en el hipocampo envejecido; específicamente los cambios de metilaciones globales del gen *Lonp1* y la regulación mediada por el factor de transcripción Mecp2. Además, evaluamos el impacto de esto sobre la acumulación de la proteína Tau PHF-1 en el interior de las mitocondrias, y su efecto en la función mitocondrial.

7.1 Metilación del ADN en el promotor de *Lonp1* en el envejecimiento

Múltiples estudios han descrito cambios en los patrones de metilación en el envejecimiento en múltiples tejidos, como el cerebro, y estas modificaciones epigenéticas son importantes reguladores de la expresión génica en la función cognitiva dependiente del hipocampo (Telese et al., 2015; Torres et al., 2019). En nuestra investigación evaluamos las metilaciones del ADN (5^{me}CpG), que son modificaciones químicas de la cromatina sin alterar la secuencia nucleotídica, y consiste en la incorporación covalente de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina que ocurren preferentemente en islas CpG. Las islas CpG se encuentran principalmente en la región promotora de los genes, y son segmentos contiguos del genoma “no metilados” que presentan un alto contenido de dinucleótidos CpG (Guo et al., 2014; Xiao et al., 2019). Las enzimas que incorporan el grupo metilo son las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs), una familia de proteínas que son los “escritores” del epigenoma (Bestor, 2000), y como donador del grupo metilo es la S-adenosil-L-metionina (Mohammed et al., 2020). La metilación del ADN en la mayoría de los estudios se asocia con represión transcripcional, ya que bloquea la unión de los factores de transcripción y complejos multiproteicos remodeladores de la cromatina (Maunakea et al., 2010). Se describió que el gen *LONP1* presenta

metilaciones en zonas reguladoras que modulan su expresión en pacientes expuestos a contaminación ambiental y síndrome de encefalomielitis miálgica (Gruzieva et al., 2017; Helliwell et al., 2020). En base a esto, nosotros realizamos predicciones de islas CpG y encontramos 4 islas CpG en la región promotora de *Lonp1*. Dos de estas islas se encuentran más cercanas al TSS, ya que está descrito que las metilaciones del ADN en proximidad al TSS son importantes en la expresión génica (Aerts et al., 2004). Confirmamos metilación y evaluamos los cambios de metilaciones globales del promotor de *Lonp1* en las citosinas de la isla CpG 3 (-444 pb / -316 pb, predicha por el programa MethPrimer), donde observamos un aumento global en la metilación ^{5me}CpG en ratones SAMP8 envejecidos (Figura 7). Así, consistente con lo observado frente a una condición ambiental o patología (Sahay et al., 2019), el gen *Lonp1* es un gen que cambia su patrón de metilación del ADN en zonas reguladoras en el hipocampo envejecido. En el envejecimiento, a nivel de la regulación del ADN por metilaciones, se ha reportado un aumento transcripcional desregulado y heterogéneo (Hernando-Herraez et al., 2019), mismo efecto observado en la metilación global del promotor de *Lonp1* en el envejecimiento.

7.2 Regulación transcripcional de *Lonp1* mediada por el factor de transcripción Mecp2

Los sitios CpG podrían estar metilados, hidroximetilados o libres de metilación y esto podría regular la afinidad de las proteínas de unión al ADN metilado (proteínas MBD) que regulan la expresión de los genes, como la proteína Mecp2 (Bird, 2002; Feng et al., 2015). Mecp2 regula sus genes de manera dual, reprimiendo o activando la expresión génica de sus genes blanco. Existen pocos estudios que reporten a Mecp2 como un regulador de la expresión de genes mitocondriales. Pecorelli y asociados, realizaron estudios transcripcionales en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con Síndrome de Rett y observaron que Mecp2 regula la expresión de genes que codifican para proteínas mitocondriales importantes en la estructura y función bioenergética (Pecorelli et al., 2013). Sumado a este estudio, Cheng y asociados, describieron un estudio de secuenciación profunda de RNA en hipocampo de ratas knockdown de Mecp2. Observaron cambios de expresión en 2 proteasas mitocondriales; la serina proteasa

Htrα2 y la proteasa dependiente de ATP Clpx. Ambas proteasas solubles, de localización en el espacio intermembrana y matriz mitocondrial respectivamente, y que regulan el control de calidad de proteínas mitocondriales junto a Lonp1 (Hammerling & Gustafsson, 2014). Interesantemente, al estudiar la localización genómica de *Clpx* encontramos que se localiza en el cromosoma 17 de ratón (Gen ID 53895) al igual que el gen *Lonp1* (Lee et al., 2021). Por lo tanto, ambos presentan una cercanía genómica y funcional que nos podría indicar que Mecp2 puede regular la expresión del gen *Lonp1*. Nuestros resultados *in silico* indican que Mecp2 posee motivos de unión en el promotor de *Lonp1* (Figura 8A) y mediante un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina corroboramos que el gen *Lonp1* es regulado por Mecp2 (Figura 8B). Es importante destacar que la interacción de Mecp2 al promotor de *Lonp1* disminuye en ratones SAMP8 envejecidos, al igual que los niveles de Mecp2 y pSer80-Mecp2, mientras que una mayor expresión de *Lonp1* (mRNA) en el hipocampo envejecido (Figura 10C), lo que sugiere que Mecp2 es un represor transcripcional de *Lonp1*, ya que una disminución de la fosforilación en Ser80, promueve una menor unión de Mecp2 a todos los promotores de sus genes blanco (Tao et al., 2009).

7.3 Niveles de proteínas y actividad proteolítica de *Lonp1* en el hipocampo de ratones envejecidos

La mayoría de los estudios de *Lonp1* están enfocados en la función que ejerce en células cancerígenas, se ha descrito un aumento en la expresión y niveles de proteínas de *Lonp1*, lo cual mantiene la homeostasis proteica y funcionalidad de la cadena transportadora de electrones, manteniendo el remodelamiento y funcionalidad de los complejos, y contrarrestando el aumento de ROS (Ghosh et al., 2019; Quiros et al., 2014), uno de los agentes de daño mitocondrial que conduce a la disfunción mitocondrial en el envejecimiento. Por el contrario, ratones haploinsuficientes de *Lonp1* presentan pérdida estructural y bioenergética de las mitocondrias (De Gaetano et al., 2020); mismo efecto observado en estudios de silenciamiento de *Lonp1* en células cancerígenas, que disminuye la estabilidad de los complejos y bioenergética mitocondrial (Lee et al., 2022; Quiros et al., 2014). El gen *Lonp1* se localiza en el núcleo (cromosoma 17), se sintetiza en ribosomas libres

en el citoplasma y se destina a la mitocondria por la secuencia de direccionamiento a la mitocondria (Gibellini et al., 2020; Pinti et al., 2015). En el año 2023 Gibellini y asociados reportaron que, frente a una condición de estrés térmico, Lonp1 se transloca al núcleo modulando la respuesta de estrés térmico, posiblemente degradando a HSF1 (Factor 1 Shock Térmico). Además, reportan que Lonp1 tiene una señal de localización nuclear (NLS), y proponen que Lonp1 se relocaliza desde la mitocondria al núcleo en células humanas. Nuestros resultados describen, por primera vez, una disminución de los niveles de proteínas de Lonp1 en una fracción enriquecida mitocondrial (Figura 11). No observamos cambios a nivel de citoplasma, lo que nos podría sugerir que no hay problemas de importe de la proteína recién sintetizada de Lonp1 a la mitocondria (Figura 11). A nivel nuclear, verificamos que Lonp1 está presente en el núcleo sin cambios en sus niveles de proteínas en el envejecimiento, corroborando los resultados de localización nuclear de Lonp1 obtenidos por los autores (Gibellini et al., 2023 y Zanini et al., 2022). Este hallazgo es novedoso ya que no existen estudios de Lonp1 que se destine al núcleo en una condición en ausencia de estrés térmico. Así, la reducción de los niveles proteicos de Lonp1 en las mitocondrias del hipocampo envejecido podrían promover una pérdida del control de calidad mitocondrial, lo que conlleva a una pérdida de la integridad del proteoma mitocondrial.

Realizamos una caracterización de la actividad proteolítica de Lonp1 mediante un kit comercial FITC-Caseína, el cual se ha reportado que mide la actividad proteolítica de Lonp1 en células humanas (Lee et al., 2022), y observamos una disminución de la actividad de proteólisis de Lonp1 en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos (Figura 12). Una posible explicación a la menor actividad proteolítica de Lonp1 podría ser la presencia de modificaciones post-traduccionales que regulan la actividad proteolítica y estabilidad de Lonp1; de las cuales se han reportado las fosforilaciones, oxidaciones y balance en su estado de acetilación. Las fosforilaciones en Serina 173 y 181 por la quinasa AKT en la mitocondria aumenta la actividad proteolítica de Lonp1 (Ghosh et al., 2019). Las modificaciones como la oxidación disminuyen la actividad de Lonp1 (Hoshino et al., 2014), y la disminución en la acetilación aumenta la ubiquitinación en lisina 63 y degradación de Lonp1 (Wu

et al., 2023). Todos estos estudios nos permiten plantear que la disminución de los niveles de proteínas y actividad proteolítica de Lonp1 podrían estar ocurriendo por estas modificaciones post-traduccionales en el envejecimiento, lo cual favorece una menor actividad y niveles de proteínas de Lonp1, de esta manera favoreciendo la acumulación de proteínas en las mitocondrias del hipocampo en el envejecimiento.

7.4 Acumulación de proteínas anómalas en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos

La proteostasis es el proceso implicado en la homeostasis del proteoma celular, que regula la síntesis, el plegamiento, el transporte y la degradación de las proteínas celulares, para mantener el equilibrio entre la integridad, cantidad y la función de las proteínas (Hipp et al., 2019). El mantenimiento del proteoma celular depende del recambio de proteínas, plegamiento, estabilización conformacional, y mecanismos de degradación celular (Hipp et al., 2019). El mecanismo de degradación de proteínas celulares más afectado en el envejecimiento es el Sistema Ubiquitina Proteasoma. Se ha reportado que la actividad del proteasoma en el hipocampo de ratas envejecidas (24 meses) presenta reducida capacidad de proteolizar un sustrato fluorogénico (Suc-LLVY-MCA) reportero de la actividad proteasomal. Además, se observa el mismo efecto al incubar con estresores celulares como el péptido A β (21-35 aa) y sulfato de hierro ($FeSO_4$) y este efecto se revierte con tratamientos antioxidantes (Keller et al., 2000). Estos resultados indican que la generación excesiva de ROS en el hipocampo envejecido impacta directamente en la disminución de la actividad de degradación de proteínas citoplasmáticas por el proteasoma, promoviendo la acumulación de proteínas en el citoplasma. En esta tesis se observó una acumulación de proteínas mal plegadas en ratones SAMP8 envejecidos en citoplasma y una fracción enriquecida de mitocondrias (Figura 13A), lo que concuerda con los reportes de la pérdida de proteostasis en el envejecimiento (Lopez-Otin et al., 2023). Interesantemente, se observó la acumulación de sustratos de Lonp1 como HMGCS2 y TFAM en una fracción mitocondrial de ratones SAMR1 de 7 meses (Figura 13B, 13C). Estos resultados se correlacionan en parte por la menor capacidad de proteólisis de Lonp1 evaluada en ratones SAMR1 de 7 meses. Se ha reportado un aumento de HMGCS2, una enzima mitocondrial que cataliza el

primer paso de cetogénesis, vía metabólica que proporciona energía de los lípidos por la disminución de carbohidratos en la dieta (Bai et al., 2023), y que podría estar asociado a cambios metabólicos que puede ocurrir en ratones adultos de mediana edad. En ratones SAMP8, se observó un aumento de TFAM en ratones envejecidos (Figura 13B, 13C), la cual se correlaciona con su menor capacidad de proteólisis y podría explicarse por modificaciones post-traduccionales de Lonp1 que regulen su actividad en el envejecimiento. Se necesitan futuros estudios para comprobar esta hipótesis.

7.5 Tau PHF-1 nuevo sustrato de Lonp1 y el efecto de la acumulación de Tau PHF-1 en mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos

La reducción de los mecanismos de proteostasis en el envejecimiento causa la acumulación de proteínas (Lopez-Otin et al., 2023), la célula sensa esta acumulación de proteínas, y activa rutas complementarias de degradación, para mantener la homeostasis celular. Varios estudios han demostrado que Lonp1 es una proteasa importante en mantener la homeostasis del proteoma mitocondrial y celular. Uno de los primeros estudios en proponer a la mitocondria y sus proteasas como guardianes del citoplasma (MAGIC) se realizó en *Saccharomyces cerevisiae*. En este estudio, se evaluó la capacidad de degradar proteínas citoplasmáticas por las proteasas mitocondriales, siendo el ortólogo de Lonp1 (PIM1), la proteasa más importante en degradar proteínas, que se internalizan a la mitocondria mediante el sistema Split-GFP. Además, estos autores reportaron la ruta de importe de proteínas no mitocondriales; vía Hsp104 -TOM70/TOM40-TIM23 y finalmente degradadas por la proteasa Lonp1 (Ruan et al., 2017). En el año 2019, Li y colaboradores propusieron este mismo mecanismo de asistencia a la degradación de proteínas citoplasmáticas por la mitocondria en células HeLa. Se propone que la interacción de la chaperona HSC70 con FUNDC1 promueve el importe de proteínas citoplasmáticas y su posterior degradación por Lonp1. En estudios de inhibición del proteasoma con MG132, se observó que aumentan los niveles de proteínas citoplasmáticas como β-catenina, p53, p62 y R-GFP (reportero de degradación proteasomal) en una fracción mitocondrial. Además, silenciar Lonp1 (sh-Lonp1) promueve un aumento de R-GFP en una fracción mitocondrial. En conjunto estos

reportes evidencian que frente a una reducción en la actividad proteasomal, la mitocondria complementa la tarea degradativa del proteasoma, y Lonp1 es la encargada principal en degradar estos sustratos. Estudios de nuestro laboratorio (manuscrito en preparación), evaluaron una potencial ruta de Tau PHF-1 a la mitocondria dependiente de HSC70/FUNDC1/Lonp1. Ensayos de co-inmunoprecipitación realizadas para Tau PHF-1 mostraron que interactúa con HSC70, FUNDC1 y Lonp1, cuya interacción está aumentada en el hipocampo de animales envejecidos (C57BL/6 18 meses), lo que favorece el importe y la acumulación de Tau PHF1 en el interior de las mitocondrias. En estudios previos de nuestro laboratorio reportamos que Tau PHF-1 se acumula en las mitocondrias del hipocampo de ratones envejecidos; específicamente en mitocondrias sinápticas de animales envejecidos (Torres et al., 2021). Tau se sintetiza en ribosomas libres en el citoplasma, y ejerce su función principal en el citoplasma celular (Tapia-Rojas, Torres, et al., 2019). Tau es una fosfoproteína, por lo que la fosforilación es su principal modificación post-traduccional regulando su unión a microtúbulos, y así la dinámica de polimerización/despolimerización de estas estructuras. En condiciones patológicas, Tau aumenta su estado de fosforilación, la cual promueve que se desprenda de la red de microtúbulos y permanezca en un estado “soluble” debido a su interacción con la chaperona HSC70 (Fontaine et al., 2015) y se degrada principalmente por el Sistema Ubiquitina Proteasoma. Hasta ahora no se ha descrito una función y localización de Tau PHF-1 en la mitocondria. En este sentido, se evaluó por varios mecanismos si Tau PHF-1 se destina a la mitocondria para ser degradada por la proteasa mitocondrial Lonp1. Evaluamos los niveles de Tau fosforilada PHF1 (Ser396 y Ser404) y esta aumenta en la fracción citoplasmática y una fracción enriquecida mitocondrial en ratones SAMP8 envejecidos, mientras que los niveles totales de la proteína Tau no presentan cambios (Figura 14A y 14B). En tratamientos *ex vivo* con 2 inhibidores reportados de Lonp1, CDDO-me y Sesamin, se observó que la pérdida de actividad de Lonp1 aumenta los niveles de los sustratos de Lonp1 TFAM y caseína (Figura 15A y 15B) y de igual manera aumenta los niveles de Tau PHF-1 en mitocondrias del hipocampo (Figura 15C y 15D). Esto además se acompaña de altos niveles de ROS (Figura 16A), y de una disminución

en el consumo de oxígeno y el ATP producido en las mitocondrias hipocampales (Figura 16B y 16C). En conjunto, podemos concluir que la acumulación de Tau PHF-1 en el interior de las mitocondrias es debido a una menor actividad de proteólisis de Lonp1, y que este escenario concuerda con los descrito en las mitocondrias del hipocampo en el envejecimiento (Torres et al., 2021). Además, que Tau sea proteolizada por mecanismos alternativos al proteasoma es consistente con estudios que demuestran que Tau fosforilada puede ser clivada por caspasas, calpaina y otras proteasas (Tapia-Rojas, Cabezas-Opazo, et al., 2019).

Finalmente, corroboramos que Tau PHF-1 se destina a la mitocondria para ser degradada por Lonp1 mediante un ensayo de degradación *in vitro* reportado previamente para esta proteasa (Bezawork-Geleta et al., 2015). Así, Tau PHF-1 es un nuevo sustrato de degradación de la proteasa mitocondrial Lonp1, y la proteólisis consume ATP (Figura 17A, 17B y 17C). Estos resultados, en conjunto con lo observado en ratones SAMP8 envejecidos donde Lonp1 presenta una capacidad reducida de proteólisis (Figura 11), proponen que la acumulación de Tau PHF-1 en una fracción enriquecida de mitocondrias de ratones envejecidos puede deberse a una degradación deficiente de Lonp1 de uno de sus sustratos (Figura 14). En efecto, mediante ensayos de degradación *in vitro* validamos que la proteasa Lonp1 de ratones SAMP8 envejecidos presenta una capacidad disminuida de proteólisis de Tau PHF-1 en comparación a Lonp1 obtenida de ratones SAMP8 adultos (Figura 17D). Finalmente, estudiando el efecto de la acumulación de Tau PHF-1 en la función bioenergética mitocondrial observamos que la incubación de mitocondrias con el citoplasma de animales SAMP8 envejecidos con altos contenidos de Tau PHF-1 (Figura 13), induce la acumulación de Tau PHF-1 en está fracción mitocondrial (Figura 18A). No observamos señal de Tau PHF-1 en la incubación con Tau pSer396, ya que el anticuerpo anti-Tau PHF-1 es un anticuerpo conformacional que reconoce ambas fosforilaciones en serina 396 y serina 404. Finalmente, observamos tanto la acumulación de Tau PHF-1 (Figura 18B) como de Tau recombinante pSer396 en la mitocondria, inducen disfunción mitocondrial (Figura 18C). Estos resultados muestran un posible mecanismo, frente a lo observado en estudios previos donde la sobreexpresión de Tau pseudofosforilada en serina

396/404 induce disfunción mitocondrial *in vitro*, en cultivos primarios de neuronas corticales maduras (14 DIV), principalmente afectando el potencial de membrana mitocondrial y aumentando el estrés oxidativo (Quintanilla et al., 2014).

Dado los resultados obtenidos en esta tesis de doctorado, se necesitan futuros estudios para confirmar los cambios en las metilaciones de las citosinas puntuales en el promotor de Lonp1 por secuenciación. Además, es necesario estudiar si las fosforilaciones en Tau PHF-1 son importantes en el reconocimiento de Lonp1, mediante estudios con mutantes fosfoinertes y/o fosfomiméticos en los residuos de serina 396/404. Finalmente, evaluar si otras modificaciones post-traduccionales de Lonp1, por ejemplo, el estado de acetilación/desacetilación y fosforilación, contribuye a una menor actividad proteolítica y menores niveles proteicos de Lonp1 en el envejecimiento.

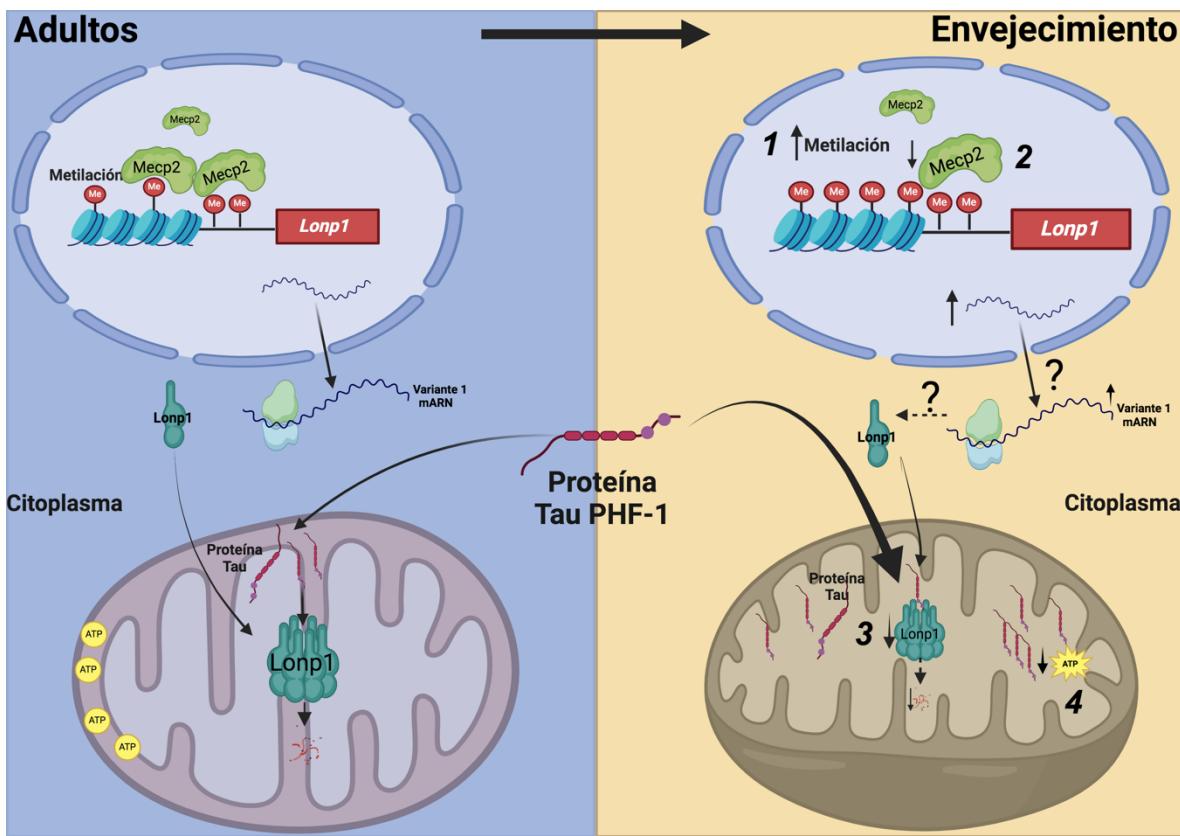


Figura 19: Representación de los principales resultados obtenidos en este trabajo de tesis Doctoral. El modelo muestra que en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos en comparación con el hipocampo de ratones SAMP8 adultos: **1)** Aumenta los niveles de metilación global en el promotor de *Lonp1*. **2)** Asimismo, ocurre una menor unión del factor de transcripción Mecp2, el cual actúa como un represor transcripcional, lo que promueve un aumento del transcripto de *Lonp1*. **3)** Los niveles de proteínas de *Lonp1* disminuyen en el núcleo, citoplasma y en la mitocondria por razones desconocidas. Además, *Lonp1* presenta una menor capacidad de proteólisis, aumentando los niveles de sus sustratos, incluida Tau PHF-1, descrita como un nuevo sustrato de *Lonp1*. **4)** Esto último promueve la acumulación de Tau PHF-1, causando alteraciones bioenergéticas y disfunción mitocondrial en el hipocampo envejecido.

8. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en esta tesis de doctorado podemos concluir lo siguiente:

- 1.- En el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos aumenta la metilación global del ADN en la región promotora del gen *Lonp1*.
- 2.- *Lonp1* es un gen blanco del factor de transcripción Mecp2, actuando como un represor transcripcional, y esta unión al promotor de *Lonp1* disminuye en el hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos, aumentando la expresión del mRNA de esta proteasa.
- 3.- Los niveles de proteína de Lonp1 están disminuidos en una fracción enriquecida de mitocondrias del hipocampo de ratones SAMP8 envejecidos.
- 4.- La proteasa Lonp1 tiene menor capacidad proteolítica en el hipocampo de ratones SAM y su actividad disminuye aún más en el envejecimiento, sugiriendo que la actividad proteolítica es regulada de manera independiente y previa al envejecimiento.
- 5.- La inhibición farmacológica de la actividad proteolítica de Lonp1 aumenta los niveles proteicos de Tau PHF-1 y reduce la función bioenergética mitocondrial.
- 6.- Tau PHF-1 es un nuevo sustrato de Lonp1 y la acumulación de Tau PHF-1 reduce la producción de ATP mitocondrial, sugiriendo disfunción bioenergética de la mitocondria.

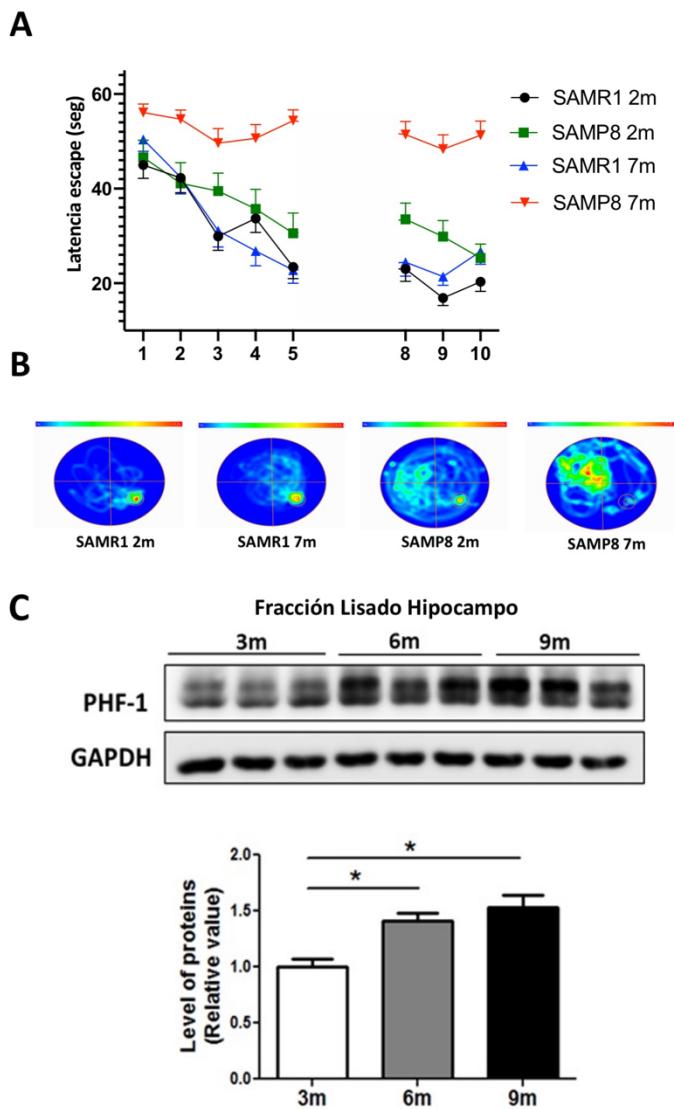
9. Proyecciones

Las proyecciones de esta investigación doctoral permitirán avanzar en nuevas estrategias terapéuticas dirigidas en la función de Lonp1 en el proceso de envejecimiento. Por lo tanto, Mecp2 sería un interesante blanco terapéutico para estimular la expresión de Lonp1, lo cual podría ayudar como un nuevo potencial tratamiento para patologías relacionadas con la edad. Además, la búsqueda de nuevos activadores de la actividad proteolítica de Lonp1 ayudaría a disminuir los niveles de proteínas patológicas, como tau PHF-1 o proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas como las Taupatias como la Enfermedad de Alzheimer.

10. Anexos

Anexo 1: Caracterización de ratones SAMP8.

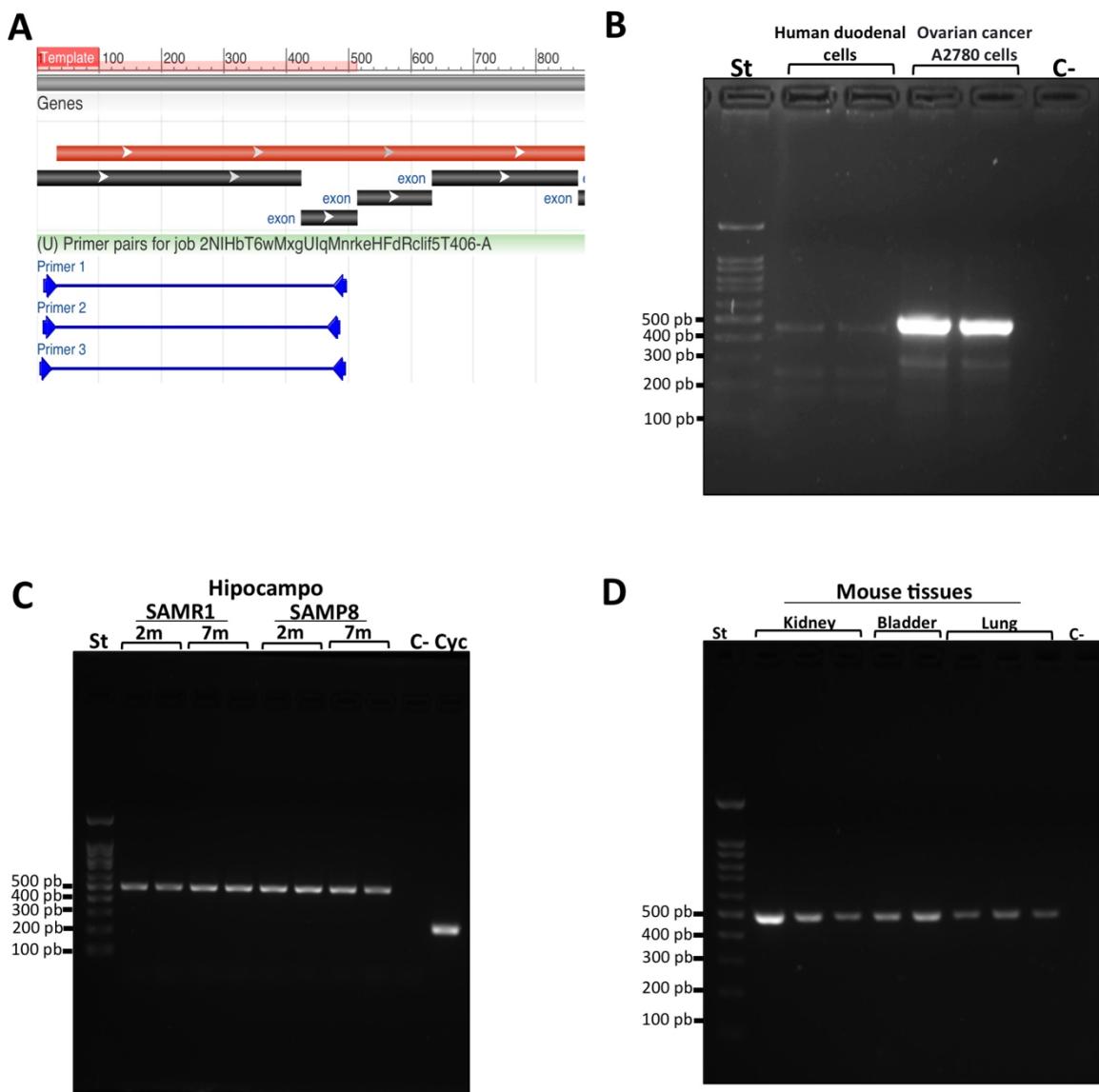
Los grupos experimentales utilizados en esta tesis de doctorado son los ratones SAMR1 (modelo murino de envejecimiento normal) y SAMP8 (modelo murino de envejecimiento acelerado) de 2 y 7 meses de edad. El ratón SAMR1 es el ratón control del SAMP8. Ambos comparten el mismo fondo genético AKR/J (Yagi et al., 1988). Evaluamos el aprendizaje y memoria espacial dependiente del hipocampo mediante el ensayo conductual Morris Water Maze en nuestros 4 grupos de ratones experimentales. Observamos que los ratones SAMP8 a los 7 meses de edad presentan latencias de escape mayores (tiempo que demora el ratón en encontrar la plataforma oculta guiados por señales espaciales) que los ratones SAMP8 de 2 meses y SAMR1 de 2 y 7 meses de edad. Estos resultados indican que los ratones SAMP8 presentan deterioro cognitivo a los 7 meses de edad y los ratones SAMP8 de 2 meses de edad y SAMR1 de 2 meses y 7 meses no presentan deterioro cognitivo y son los grupos experimentales no envejecidos (Anexo 1A y 1B). Además los niveles de proteínas de Tau PHF-1 se acumula en un lisado total de hipocampo en ratones SAMP8 a partir de los 6 meses de edad (Anexo 1C).



Anexo 1: Pérdida de memoria espacial en ratones SAMP8 de 7 meses de edad. (A) Latencia de escape durante la prueba de Morris Water Maze. (B) Mapa de calor de cada grupo experimental durante el día 10. (C) Western Blot de Tau PHF-1 en un lisado total del hipocampo de ratones SAMP8 de 3, 6 y 9 meses de edad. Análisis densitométrico de los niveles de Tau PHF-1 normalizada por la expresión de GAPDH. N=3. Las barras del gráfico representan las medias \pm SEM. p<0.05 (*). ANOVA de 1 vía con post-test de Bonferroni.

Anexo 2: Análisis de las variantes de ARNm de la proteasa Lonp1.

La proteasa Lonp1 en *Mus musculus* está codificada por el gen nuclear *Lonp1*. Hasta ahora sólo existen estudios en humanos, donde se ha reportado la presencia de las tres variantes de ARN mensajero (ARNm) de *LONP1*, generada por empalme alternativo del exón 1 (Gibellini et al., 2020; Zanini et al., 2022). Evaluamos las 3 variantes de ARNm están presentes en ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses mediante la técnica de RT-PCR y diseñamos partidores que flanquean el exón1 (Tabla 2), el diseño de partidores fue validado utilizando las líneas celulares de cáncer de ovario y duodeno humano A2780, para las que se han reportado las 3 variantes de ARNm de *LONP1* (Zanini et al., 2022) (**Anexo 2B**). Observamos las tres variantes de ARNm y una mayor expresión de *LONP1* en las células cancerosas en comparación con las células normales, lo que concuerda con estudios que han observado el mismo aumento de expresión de *Lonp1* en células cancerígenas (Ghosh et al., 2019; Wu et al., 2023). A continuación, evaluamos la presencia de las 3 variantes de ARNm en el hipocampo de estos ratones y, sorprendentemente, sólo observamos la presencia de la variante 1 de ARNm de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses, que es la variante de ARNm sin splicing alternativo y que codifica para la isoforma proteica de longitud completa de *Lonp1* (**Anexo 2C**). No identificamos las variantes 2 y 3 del ARNm de *Lonp1* en el hipocampo de los ratones SAMR1 y SAMP8 mediante esta estrategia experimental. Además, evaluamos en los tejidos de riñón, vejiga y pulmón, los cuales están enriquecidos en mitocondrias y que requieren una alta demanda energética para llevar a cabo sus funciones, corroborando únicamente la presencia de la variante 1 del ARNm de *Lonp1* en ratones utilizando esta estrategia experimental (**Anexo 2D**).



Anexo 2: La variante 1 del mRNA para la proteasa Lonp1 se expresa en tejidos de ratón. (A) Mapa genético del gen *Lonp1* y alineamiento de los partidores que flanquean el exón1 para evaluar las variantes de splicing del ARNm de *Lonp1* en ratón. (B) Producto de PCR de las variantes de ARNm de *LONP1* en células humanas mediante RT-PCR convencional. (C) Producto de PCR de la variante 1 del ARNm de *Lonp1* en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2 y 7 meses identificado por RT-PCR convencional (n=3). (D) Producto de PCR de la variante 1 del ARNm de *Lonp1* en riñón, vejiga y pulmón de ratones SAMR1 de 2 meses mediante RT-PCR convencional. Peso molecular estándar de 100 pb. Gel de agarosa al 2 % (n=6).

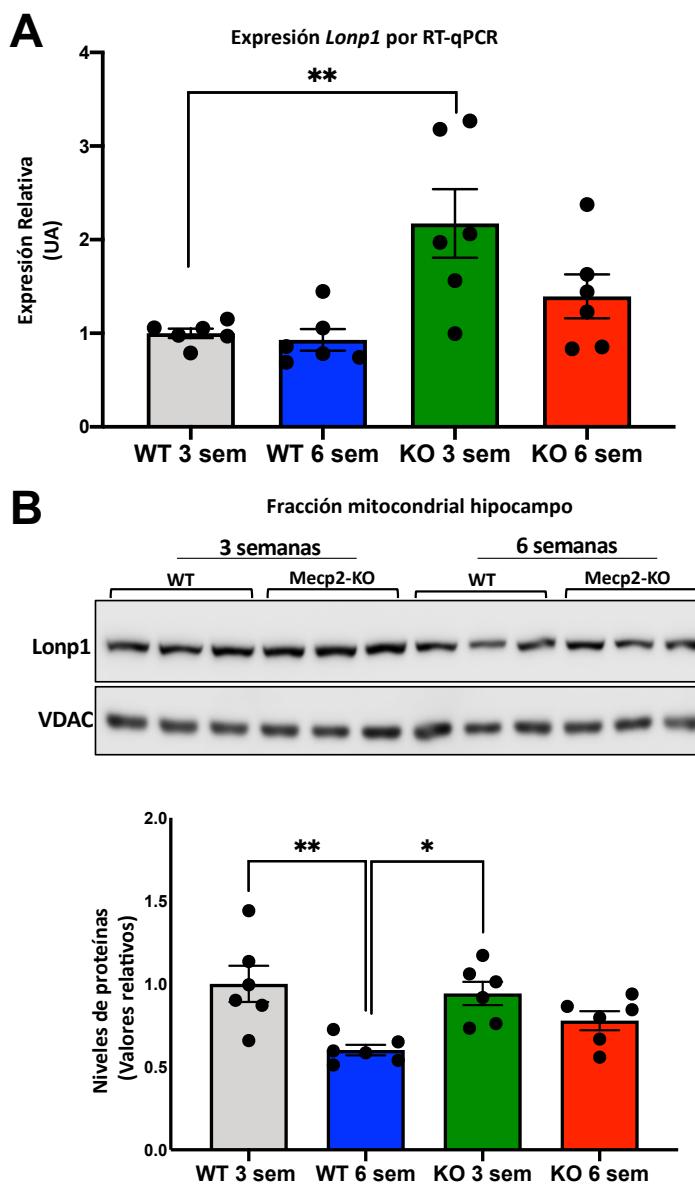
Tabla anexo 2: Secuencia de partidores para PCR en convencional.

| Gene | Forward primer | Reverse primer |
|-----------------------|----------------------------|------------------------------|
| <i>Lonp1</i> Exón 1-2 | 5' CGGTGCGCCGTCAGTAT 3' | 5'- AGGAAGACGCCAACATAGGG -3' |
| <i>LONP1</i> Exón 1-2 | 5'- CTATGGCGGCGAGCACTG -3' | 5'- TGGGCGAGACGAACTTCC -3' |

Anexo 3: Análisis de expresión y niveles de proteínas de la proteasa Lonp1 en el hipocampo de ratones Mecp2-KO y WT.

Los ratones Mecp2-KO corresponden al modelo desarrollado en el laboratorio de Adrian Bird (Guy et al., 2007). Los ratones fundadores obtenidos The Jackson Laboratory (stock Nº 003890). Hembras heterocigotas para Mecp2 en un fondo genético C57BL/6:129/SvJ fueron cruzadas con machos silvestres en un fondo 129/SvJ. Utilizamos machos WT y KO para Mecp2 y sus hermanos silvestres de 3 y 6 semanas de edad. Los ratones fueron reproducidos y mantenidos en el bioriego de la Fundación Ciencia y Vida. Antes de realizar los experimentos, fueron trasladados hasta la sala de mantención del CEBICEM y mantenidos a temperatura ambiente promedio de 22-24°C, con ciclos diarios de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con comida y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales de los ratones fueron aprobados por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Universidad San Sebastián. La formulación de ética fue aprobada por el comité ético científico de la Universidad San Sebastián, código interno CEC Nº 23-2021-20.

En ratones nulos para Mecp2 (Mecp2-KO) se han evaluado cambios en la expresión de genes blanco de Mecp2 en comparación al ratón WT, y que nos permite plantear si Mecp2 pueda regular la expresión del gen *Lonp1* (Pejhan & Rastegar, 2021). Este modelo murino es viable hasta la 7-8 semanas de edad, en base a este antecedente, utilizamos ratones de 3 y 6 semanas de edad que están en condiciones saludables. Evaluamos los niveles de transcritos y proteínas de *Lonp1*. Observamos que los ratones nulos para Mecp2 mostraban mayores niveles de transcritos a las 3 semanas ($2.173 \pm 0,8970$) en comparación al WT de 3 semanas ($1.000 \pm 0,1225$), y proteínas de *Lonp1* observamos que los ratones nulos para Mecp2 mostraban mayores niveles de proteínas a las 6 semanas ($0,6011 \pm 0,07769$) en comparación al WT de 3 semanas ($0,9924 \pm 0,1723$) (**Anexo 3**). Estos resultados sugieren que Mecp2 podría actuar como un represor transcripcional de *Lonp1*.



Anexo 3: Cambios en los niveles de proteínas de *Lonp1* en una fracción de mitocondrias del hipocampo de ratones controles y mutantes nulos para *Mecp2*. (A) Cuantificación relativa de la expresión de *Lonp1* en el hipocampo de ratones silvestres (WT) y mutantes nulos para *Mecp2* (KO) de 3 y 6 semanas mediante RT-qPCR, la expresión de *Lonp1* fue normalizada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el gen housekeeping Ciclofilina A. (B) Western Blot de *Lonp1* en extractos proteicos de hipocampo de ratones silvestres (WT) y mutantes nulos para *Mecp2* (KO) de 3 y 6 semanas. Análisis densitométrico de los niveles totales de *Lonp1* normalizada por la expresión de VDAC como control de carga. n=6 para RT-qPCR; n=3 animales para análisis de Western Blot. Los datos se presentan como medias \pm SEM; p<0.05 (*); p<0,01 (**). ANOVA de 1 vía con post-test de Bonferroni.

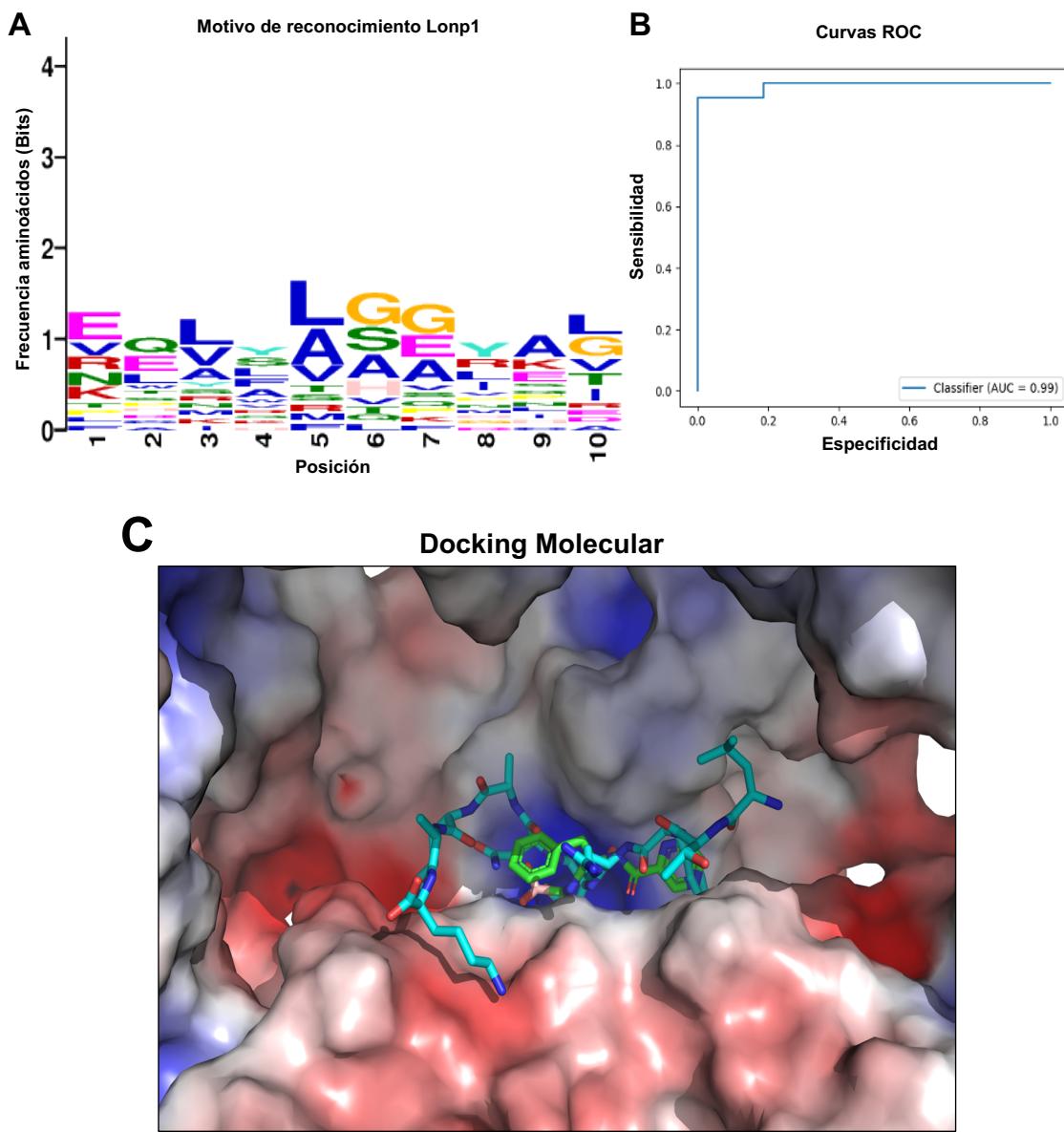
Anexo 4: Análisis bioinformático para el sitio de reconocimiento de la proteasa Lonp1 y Docking Molecular de la proteína Tau PHF-1 en el sitio catalítico de Lonp1.

Para evaluar si tau PHF-1 es un sustrato de Lonp1, realizamos un enfoque bioinformático, y generamos un motivo de reconocimiento para Lonp1 mediante herramientas bioinformáticas de acceso libre en la web, es importante destacar que no se había descrito un motivo de reconocimiento para Lonp1. En base a esto, nosotros realizamos una búsqueda de sustratos reportados por la literatura científica para la proteasa Lonp1, cuya secuencia primaria de corte este secuenciado, sólo encontramos secuencia descrita para Lonp1 humana (hLonp1) y Lonp1 E. coli (EcLon) (Gur & Sauer, 2008). Luego definimos cada una de las secuencias reportadas por: longitud, composición de aminoácidos (aa) y sitios de corte de la proteasa Lonp1 utilizando el programa BioPython. BioPython es una herramienta informática que compila una serie de aplicaciones y programas bioinformáticos, y utiliza el lenguaje de programación de Python, facilitando la tarea de obtener una información detallada y específica del motivo de reconocimiento de Lonp1. Mediante BioPython, se definieron los fragmentos peptídicos de un largo de 10 aa: 5 aa río arriba y 5 aa río abajo con respecto al sitio de corte primario de la proteasa Lonp1, y se extrajeron los fragmentos peptídicos de las secuencias de los sustratos utilizando un script de Python 3/BioPython. A partir del script generamos un archivo de salida en formato FASTA para los fragmentos peptídicos alineados según el sitio de corte primario reportado. Luego, utilizamos la suite de programas bioinformáticos MEME (Bailey et al., 2009) para detectar motivos (patrones) de aminoácidos de reconocimiento de la proteasa Lonp1 en base a matrices de puntuación de posición específica (PSSM, por sus siglas en inglés), generamos varios motivos de reconocimiento de Lonp1, y elegimos un motivo con mejor p-value mediante el archivo generado de los fragmentos peptídicos por script de Python (**Anexo 4A**). Además, evaluamos si la proteína Tau PHF-1 isoforma 2N4R presenta secuencias de reconocimiento específicos propuestos para Lonp1 en la suite de MEME. Escaneamos la secuencia de la proteína Tau 2N4R de 441 aminoácidos

con un motivo de reconocimiento de 10 aa generado a partir de sustratos reportados de hLonp1. Identificamos 2 coincidencias que generan 3 fragmentos de digestión proteolítica de Lonp1 de la proteína Tau isoforma 2N4R de 441 aminoácidos (**Tabla anexo 4**). Es importante destacar que la proteína que nosotros identificamos al interior de la mitocondria es Tau PHF-1 de un tamaño de 441 aa (isoforma 2N4R) y que tiene los epitopes de fosforilación de Ser396 y Ser404. De los fragmentos predichos generados encontramos: i) 93 aa-448 aa y ii) 429 aa-441 aa, donde se encuentran las fosforilaciones en Ser396 y Ser404, como se ha descrito anteriormente, la fosforilación es importante en el reconocimiento y degradación de la proteasa Lonp1, por ejemplo, la proteína TFAM, que una vez fosforilada es reconocida y degradada por Lonp1 (Lu et al., 2013).

Para validar los motivos de reconocimiento de Lonp1, se evaluaron en secuencias no relacionadas o sustratos no degradados por Lonp1 (controles negativos) y en secuencias de sustratos conocidos de la proteasa que no se utilizaron para la generación de los modelos (controles positivos) mediante Receiver Operating Characteristic (ROC), de esta manera evaluamos la sensibilidad y especificidad del motivo de reconocimiento de hLonp1. Nosotros observamos un área bajo la curva (AUC)= 0.99, la cual indica que con un 99% de confianza, el motivo de reconocimiento de Lonp1 generado es capaz de discriminar o reconocer a los sustratos positivos en comparación a los sustratos negativos. Un motivo de un tamaño de 10 aa es razonable para describir las secuencias de reconocimiento de sustrato de hLonP1 centradas en su sitio de escisión (**Anexo 4B**). Finalmente, realizamos el método basado en estructuras (docking & MM-PBSA). En base a este método, preparamos péptidos de 10 aa de longitud que se acoplaron con AutoDock CrankPep (<https://ccsb.scripps.edu/adcp/>) a una estructura cristalizada trimérica de hLonP1 unido al inhibidor bortezomib, inhibidor reportado para el proteasoma y Lonp1 (código de acceso: PDB 7krz). El trímero corresponde a una mitad de la estructura hexamérica (conformación activa de Lonp1). Se realizaron evaluaciones 5M y 300 corridas de docking. De ellas, las 100 mejores poses de acoplamiento se filtraron mediante una restricción de distancia consistente en que el enlace “scissile” se encuentra a menos de 3,8 Å del residuo catalítico de Lonp1, Ser 855. Por último,

los péptidos filtrados se sometieron a una prueba de acoplamiento, un análisis MM-PBSA (sólo minimización) para estimar la energía libre de enlace. Es importante destacar que estas energías no son realmente energías libres, ya que se omitió la contribución entrópica, y nos indica que los decapéptidos generados no tienen un impedimento estérico en el motivo proteolítico, Ser 855 catalítica de Lonp1 (**Anexo 4C**).



Anexo 4: La proteína Tau PHF-1 es un nuevo sustrato de la proteasa mitocondrial Lonp1. (A) Generación del motivo de reconocimiento de la proteasa mitocondrial Lonp1 usando las secuencias sustratos reportados de la proteasa Lonp1. (B) Curvas ROC que demuestra la capacidad de discriminar sustratos positivos y negativos del motivo de reconocimiento de Lonp1 basados en los métodos (MEME) y de estructura (MM-PBSA). (C) Docking molecular de decapéptidos de la proteína Tau (LTFRENAKAK, DG = -39.2 kcal/mol) generados para el sitio de unión de hLonp1 (Código PDB: 7krz). La superficie de la proteína presenta colores según el potencial electrostático (rojo: negativo, azul: positivo, gris claro: neutro). El péptido se muestra en cian y el inhibidor bortezomib cocristalizado con hLonP1 se muestra en verde.

Tabla anexo 4: Predicción bioinformática de productos de corte proteolítico predichos de tau 2N4R por el método MEME. El peso molecular en kDa (MW) se estimó con Expasy. El MW ajustado se multiplicó por 1,2 para ajustarlo a la diferencia entre el MW teórico y el observado de tau 2N4R mediante western blot.

| p-value corte | Secuencia inicio-fin | Peso molecular (MW [kDa]) | Peso molecular Ajustado (MW [kDa]) |
|---------------|----------------------|---------------------------|------------------------------------|
| No cleavage | 1 – 441 | 45.9 | 55.0 |
| 0.01 | 1 – 92 | 9.7 | 11.6 |
| 0.01 | 93 – 428 | 34.9 | 41.9 |
| 0.01 | 429 – 441 | 1.3 | 1.5 |

11 Bibliografía

- Aerts, S., Thijs, G., Dabrowski, M., Moreau, Y., & De Moor, B. (2004). Comprehensive analysis of the base composition around the transcription start site in Metazoa. *BMC Genomics*, 5(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-34>
- Akiguchi, I., Pallas, M., Budka, H., Akiyama, H., Ueno, M., Han, J., Yagi, H., Nishikawa, T., Chiba, Y., Sugiyama, H., Takahashi, R., Unno, K., Higuchi, K., & Hosokawa, M. (2017). SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology*, 37(4), 293-305. <https://doi.org/10.1111/neup.12373>
- Avila, J., Jimenez, J. S., Sayas, C. L., Bolos, M., Zabala, J. C., Rivas, G., & Hernandez, F. (2016). Tau Structures. *Front Aging Neurosci*, 8, 262. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00262>
- Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M., & Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*, 84(2), 361-384. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2003>
- Bahat, A., Perlberg, S., Melamed-Book, N., Isaac, S., Eden, A., Lauria, I., Langer, T., & Orly, J. (2015). Transcriptional activation of LON Gene by a new form of mitochondrial stress: A role for the nuclear respiratory factor 2 in StAR overload response (SOR). *Mol Cell Endocrinol*, 408, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.02.022>
- Bai, M., Wu, M., Jiang, M., He, J., Deng, X., Xu, S., Fan, J., Miao, M., Wang, T., Li, Y., Yu, X., Wang, L., Zhang, Y., Huang, S., Yang, L., Jia, Z., & Zhang, A. (2023). LONP1 targets HMGCS2 to protect mitochondrial function and attenuate chronic kidney disease. *EMBO Mol Med*, 15(2), e16581. <https://doi.org/10.15252/emmm.202216581>
- Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, 9(16), 2395-2402. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2395>
- Bezawork-Geleta, A., Brodie, E. J., Dougan, D. A., & Truscott, K. N. (2015). LON is the master protease that protects against protein aggregation in human mitochondria through direct degradation of misfolded proteins. *Sci Rep*, 5, 17397. <https://doi.org/10.1038/srep17397>
- Bienvenu, T., & Chelly, J. (2006). Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet*, 7(6), 415-426. <https://doi.org/10.1038/nrg1878>
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16(1), 6-21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Butterfield, D. A., Howard, B. J., Yatin, S., Allen, K. L., & Carney, J. M. (1997). Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitronone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(2), 674-678. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.674>
- Campello, S., Strappazzon, F., & Cecconi, F. (2014). Mitochondrial dismissal in mammals, from protein degradation to mitophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1837(4), 451-460. <https://doi.org/10.1016/j.bbabiobio.2013.11.010>

- Casillas, M. A., Jr., Lopatina, N., Andrews, L. G., & Tollefsbol, T. O. (2003). Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, 252(1-2), 33-43. <https://doi.org/10.1023/a:1025548623524>
- Chandler, S. P., Guschin, D., Landsberger, N., & Wolffe, A. P. (1999). The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry*, 38(22), 7008-7018. <https://doi.org/10.1021/bi990224y>
- Chen, M. Z., Moily, N. S., Bridgford, J. L., Wood, R. J., Radwan, M., Smith, T. A., Song, Z., Tang, B. Z., Tilley, L., Xu, X., Reid, G. E., Pouladi, M. A., Hong, Y., & Hatters, D. M. (2017). A thiol probe for measuring unfolded protein load and proteostasis in cells. *Nat Commun*, 8(1), 474. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00203-5>
- Chen, W. G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A. E., Griffith, E. C., Jaenisch, R., & Greenberg, M. E. (2003). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*, 302(5646), 885-889. <https://doi.org/10.1126/science.1086446>
- Cheng, T. L., Chen, J., Wan, H., Tang, B., Tian, W., Liao, L., & Qiu, Z. (2017). Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain. *Sci Rep*, 7, 42790. <https://doi.org/10.1038/srep42790>
- Coux, O., Tanaka, K., & Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, 65, 801-847. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.004101>
- Crespo-Biel, N., Theunis, C., & Van Leuven, F. (2012). Protein tau: prime cause of synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 251426. <https://doi.org/10.1155/2012/251426>
- De Gaetano, A., Gibellini, L., Bianchini, E., Borella, R., De Biasi, S., Nasi, M., Boraldi, F., Cossarizza, A., & Pinti, M. (2020). Impaired Mitochondrial Morphology and Functionality in Lorp1(wt-) Mice. *J Clin Med*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/jcm9061783>
- Drewell, R. A., Goddard, C. J., Thomas, J. O., & Surani, M. A. (2002). Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res*, 30(5), 1139-1144. <https://doi.org/10.1093/nar/30.5.1139>
- Eckert, G. P., Schiborr, C., Hagl, S., Abdel-Kader, R., Muller, W. E., Rimbach, G., & Frank, J. (2013). Curcumin prevents mitochondrial dysfunction in the brain of the senescence-accelerated mouse-prone 8. *Neurochem Int*, 62(5), 595-602. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.014>
- Falkevall, A., Alikhani, N., Bhushan, S., Pavlov, P. F., Busch, K., Johnson, K. A., Eneqvist, T., Tjernberg, L., Ankarcrona, M., & Glaser, E. (2006). Degradation of the amyloid beta-protein by the novel mitochondrial peptidasome, Prep. *J Biol Chem*, 281(39), 29096-29104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602532200>
- Feng, J., Shao, N., Szulwach, K. E., Vialou, V., Huynh, J., Zhong, C., Le, T., Ferguson, D., Cahill, M. E., Li, Y., Koo, J. W., Ribeiro, E., Labonte, B., Laitman, B. M., Estey, D., Stockman, V., Kennedy, P., Courousse, T., Mensah, I., Turecki, G., Faull, K. F., Ming, G. L., Song, H., Fan, G., Casaccia, P., Shen, L., Jin, P., & Nestler, E. J. (2015). Role of Tet1 and 5-

- hydroxymethylcytosine in cocaine action. *Nat Neurosci*, 18(4), 536-544. <https://doi.org/10.1038/nn.3976>
- Flood, J. F., & Morley, J. E. (1998). Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neurosci Biobehav Rev*, 22(1), 1-20. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(96\)00063-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00063-2)
- Fontaine, S. N., Martin, M. D., Akoury, E., Assimon, V. A., Borysov, S., Nordhues, B. A., Sabbagh, J. J., Cockman, M., Gestwicki, J. E., Zweckstetter, M., & Dickey, C. A. (2015). The active Hsc70/tau complex can be exploited to enhance tau turnover without damaging microtubule dynamics. *Hum Mol Genet*, 24(14), 3971-3981. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv135>
- Free, A., Wakefield, R. I., Smith, B. O., Dryden, D. T., Barlow, P. N., & Bird, A. P. (2001). DNA recognition by the methyl-CpG binding domain of MeCP2. *J Biol Chem*, 276(5), 3353-3360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007224200>
- Fu, G. K., & Markovitz, D. M. (1998). The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry*, 37(7), 1905-1909. <https://doi.org/10.1021/bi970928c>
- Ghosh, J. C., Seo, J. H., Agarwal, E., Wang, Y., Kossenkov, A. V., Tang, H. Y., Speicher, D. W., & Altieri, D. C. (2019). Akt phosphorylation of mitochondrial Lonp1 protease enables oxidative metabolism and advanced tumor traits. *Oncogene*, 38(43), 6926-6939. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0939-7>
- Gibellini, L., Borella, R., De Gaetano, A., Zanini, G., Tartaro, D. L., Carnevale, G., Beretti, F., Losi, L., De Biasi, S., Nasi, M., Forcato, M., Cossarizza, A., & Pinti, M. (2022). Evidence for mitochondrial Lonp1 expression in the nucleus. *Sci Rep*, 12(1), 10877. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14860-0>
- Gibellini, L., De Gaetano, A., Mandrioli, M., Van Tongeren, E., Bortolotti, C. A., Cossarizza, A., & Pinti, M. (2020). The biology of Lonp1: More than a mitochondrial protease. *Int Rev Cell Mol Biol*, 354, 1-61. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.02.005>
- Gibellini, L., Pinti, M., Beretti, F., Pierri, C. L., Onofrio, A., Riccio, M., Carnevale, G., De Biasi, S., Nasi, M., Torelli, F., Boraldi, F., De Pol, A., & Cossarizza, A. (2014). Sirtuin 3 interacts with Lon protease and regulates its acetylation status. *Mitochondrion*, 18, 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.08.001>
- Glynn, S. E. (2017). Multifunctional Mitochondrial AAA Proteases. *Front Mol Biosci*, 4, 34. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00034>
- Gruzieva, O., Xu, C. J., Breton, C. V., Annesi-Maesano, I., Anto, J. M., Auffray, C., Ballereau, S., Bellander, T., Bousquet, J., Bustamante, M., Charles, M. A., de Kluizenaar, Y., den Dekker, H. T., Duijts, L., Felix, J. F., Gehring, U., Guxens, M., Jaddoe, V. V., Jankipersadsing, S. A., Merid, S. K., Kere, J., Kumar, A., Lemonnier, N., Lepeule, J., Nystad, W., Page, C. M., Panasevich, S., Postma, D., Slama, R., Sunyer, J., Soderhall, C., Yao, J., London, S. J., Pershagen, G., Koppelman, G. H., & Melen, E. (2017). Epigenome-Wide Meta-Analysis of Methylation in Children Related to Prenatal NO₂ Air Pollution Exposure. *Environ Health Perspect*, 125(1), 104-110. <https://doi.org/10.1289/EHP36>
- Guo, J. U., Su, Y., Shin, J. H., Shin, J., Li, H., Xie, B., Zhong, C., Hu, S., Le, T., Fan, G., Zhu, H., Chang, Q., Gao, Y., Ming, G. L., & Song, H. (2014). Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci*, 17(2), 215-222. <https://doi.org/10.1038/nn.3607>

- Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol*, 133(5), 665-704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>
- Gur, E., & Sauer, R. T. (2008). Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease. *Genes Dev*, 22(16), 2267-2277. <https://doi.org/10.1101/gad.1670908>
- Guy, J., Gan, J., Selfridge, J., Cobb, S., & Bird, A. (2007). Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science*, 315(5815), 1143-1147. <https://doi.org/10.1126/science.1138389>
- Hammerling, B. C., & Gustafsson, A. B. (2014). Mitochondrial quality control in the myocardium: cooperation between protein degradation and mitophagy. *J Mol Cell Cardiol*, 75, 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.07.013>
- Hanger, D. P., Anderton, B. H., & Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*, 15(3), 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.003>
- He, L., Luo, D., Yang, F., Li, C., Zhang, X., Deng, H., & Zhang, J. R. (2018). Multiple domains of bacterial and human Lon proteases define substrate selectivity. *Emerg Microbes Infect*, 7(1), 149. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0148-4>
- Helliwell, A. M., Sweetman, E. C., Stockwell, P. A., Edgar, C. D., Chatterjee, A., & Tate, W. P. (2020). Changes in DNA methylation profiles of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients reflect systemic dysfunctions. *Clin Epigenetics*, 12(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00960-z>
- Hernando-Herraez, I., Evano, B., Stubbs, T., Commere, P. H., Jan Bonder, M., Clark, S., Andrews, S., Tajbakhsh, S., & Reik, W. (2019). Ageing affects DNA methylation drift and transcriptional cell-to-cell variability in mouse muscle stem cells. *Nat Commun*, 10(1), 4361. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12293-4>
- Hipp, M. S., Kasturi, P., & Hartl, F. U. (2019). The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(7), 421-435. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y>
- Hoshino, A., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Kaimoto, S., Uchihashi, M., Fukai, K., Iwai-Kanai, E., & Matoba, S. (2014). Oxidative post-translational modifications develop LONP1 dysfunction in pressure overload heart failure. *Circ Heart Fail*, 7(3), 500-509. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.001062>
- Huttunen, H. J., Guenette, S. Y., Peach, C., Greco, C., Xia, W., Kim, D. Y., Barren, C., Tanzi, R. E., & Kovacs, D. M. (2007). HtrA2 regulates beta-amyloid precursor protein (APP) metabolism through endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem*, 282(38), 28285-28295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702951200>
- Ianov, L., Riva, A., Kumar, A., & Foster, T. C. (2017). DNA Methylation of Synaptic Genes in the Prefrontal Cortex Is Associated with Aging and Age-Related Cognitive Impairment. *Front Aging Neurosci*, 9, 249. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00249>
- Jara, C., Aranguiz, A., Cerpa, W., Tapia-Rojas, C., & Quintanilla, R. A. (2018). Genetic ablation of tau improves mitochondrial function and cognitive abilities

- in the hippocampus. *Redox Biol*, 18, 279-294.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.07.010>
- Jara, C., Cerpa, W., Tapia-Rojas, C., & Quintanilla, R. A. (2020). Tau Deletion Prevents Cognitive Impairment and Mitochondrial Dysfunction Age Associated by a Mechanism Dependent on Cyclophilin-D. *Front Neurosci*, 14, 586710. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.586710>
- Johnson, G. V., & Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci*, 117(Pt 24), 5721-5729. <https://doi.org/10.1242/jcs.01558>
- Jung, M., & Pfeifer, G. P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC Biol*, 13, 7. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0118-4>
- Kalvala, A. K., Yerra, V. G., & Kumar, A. (2020). LONP1 induction by SRT1720 attenuates mitochondrial dysfunction against high glucose induced neurotoxicity in PC12 cells. *Toxicol In Vitro*, 62, 104695. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104695>
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Proteostasis and aging. *Nat Med*, 21(12), 1406-1415. <https://doi.org/10.1038/nm.4001>
- Keller, J. N., Hanni, K. B., & Markesberry, W. R. (2000). Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 75(1), 436-439. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750436.x>
- Korovila, I., Hugo, M., Castro, J. P., Weber, D., Hohn, A., Grune, T., & Jung, T. (2017). Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol*, 13, 550-567. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.008>
- Langie, S. A., Cameron, K. M., Ficz, G., Oxley, D., Tomaszewski, B., Gorniak, J. P., Maas, L. M., Godschalk, R. W., van Schooten, F. J., Reik, W., von Zglinicki, T., & Mathers, J. C. (2017). The Ageing Brain: Effects on DNA Repair and DNA Methylation in Mice. *Genes (Basel)*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/genes8020075>
- Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Clos, A. L., Jackson, G. R., & Kayed, R. (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener*, 6, 39. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-39>
- Lee, J., Pandey, A. K., Venkatesh, S., Thilagavathi, J., Honda, T., Singh, K., & Suzuki, C. K. (2022). Inhibition of mitochondrial LonP1 protease by allosteric blockade of ATP binding and hydrolysis via CDDO and its derivatives. *J Biol Chem*, 298(3), 101719. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101719>
- Lee, Y. G., Kim, H. W., Nam, Y., Shin, K. J., Lee, Y. J., Park, D. H., Rhee, H. W., Seo, J. K., & Chae, Y. C. (2021). LONP1 and ClpP cooperatively regulate mitochondrial proteostasis for cancer cell survival. *Oncogenesis*, 10(2), 18. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00306-1>
- Lemaitre, H., Goldman, A. L., Sambataro, F., Verchinski, B. A., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D. R., & Mattay, V. S. (2012). Normal age-related brain morphometric changes: nonuniformity across cortical thickness, surface area and gray matter volume? *Neurobiol Aging*, 33(3), 617 e611-619. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.07.013>

- Li, L. C., & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18(11), 1427-1431. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.11.1427>
- Li, Y., Xue, Y., Xu, X., Wang, G., Liu, Y., Wu, H., Li, W., Wang, Y., Chen, Z., Zhang, W., Zhu, Y., Ji, W., Xu, T., Liu, L., & Chen, Q. (2019). A mitochondrial FUNDC1/HSC70 interaction organizes the proteostatic stress response at the risk of cell morbidity. *EMBO J.*, 38(3). <https://doi.org/10.15252/embj.201798786>
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S., & Chen, Q. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 14(2), 177-185. <https://doi.org/10.1038/ncb2422>
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243-278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- Lores-Arnaiz, S., Lombardi, P., Karadayian, A. G., Orgambide, F., Cicerchia, D., & Bustamante, J. (2016). Brain cortex mitochondrial bioenergetics in synaptosomes and non-synaptic mitochondria during aging. *Neurochem Res*, 41(1-2), 353-363. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1817-5>
- Lu, B., Lee, J., Nie, X., Li, M., Morozov, Y. I., Venkatesh, S., Bogenhagen, D. F., Temiakov, D., & Suzuki, C. K. (2013). Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease. *Mol Cell*, 49(1), 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.023>
- Ly, C. V., & Verstreken, P. (2006). Mitochondria at the synapse. *Neuroscientist*, 12(4), 291-299. <https://doi.org/10.1177/1073858406287661>
- Maunakea, A. K., Nagarajan, R. P., Bilenky, M., Ballinger, T. J., D'Souza, C., Fouse, S. D., Johnson, B. E., Hong, C., Nielsen, C., Zhao, Y., Turecki, G., Delaney, A., Varhol, R., Thiessen, N., Shchors, K., Heine, V. M., Rowitch, D. H., Xing, X., Fiore, C., Schillebeeckx, M., Jones, S. J., Haussler, D., Marra, M. A., Hirst, M., Wang, T., & Costello, J. F. (2010). Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*, 466(7303), 253-257. <https://doi.org/10.1038/nature09165>
- Miyamoto, M., Kiyota, Y., Yamazaki, N., Nagaoka, A., Matsuo, T., Nagawa, Y., & Takeda, T. (1986). Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav*, 38(3), 399-406. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90112-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90112-5)
- Mohammed, S. A., Ambrosini, S., Luscher, T., Paneni, F., & Costantino, S. (2020). Epigenetic Control of Mitochondrial Function in the Vasculature. *Front Cardiovasc Med*, 7, 28. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00028>
- Montecinos-Oliva, C., Arrazola, M. S., Jara, C., Tapia-Rojas, C., & Inestrosa, N. C. (2020). Hormetic-Like Effects of L-Homocysteine on Synaptic Structure, Function, and Abeta Aggregation. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/ph13020024>
- 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 Biol.*, 34, 101558. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101558>
- Oliveira, A. M., Hemstedt, T. J., & Bading, H. (2012). Rescue of aging-associated decline in Dnmt3a2 expression restores cognitive abilities. *Nat Neurosci*, 15(8), 1111-1113. <https://doi.org/10.1038/nn.3151>
- Opalinska, M., & Janska, H. (2018). AAA Proteases: Guardians of Mitochondrial Function and Homeostasis. *Cells*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/cells7100163>
- Orejana, L., Barros-Minones, L., Jordan, J., Puerta, E., & Aguirre, N. (2012). Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. *Neurobiol Aging*, 33(3), 625 e611-620. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.018>
- Pecorelli, A., Leoni, G., Cervellati, F., Canali, R., Signorini, C., Leoncini, S., Cortelazzo, A., De Felice, C., Ciccoli, L., Hayek, J., & Valacchi, G. (2013). Genes related to mitochondrial functions, protein degradation, and chromatin folding are differentially expressed in lymphomonocytes of Rett syndrome patients. *Mediators Inflamm*, 2013, 137629. <https://doi.org/10.1155/2013/137629>
- Pejhan, S., & Rastegar, M. (2021). Role of DNA Methyl-CpG-Binding Protein MeCP2 in Rett Syndrome Pathobiology and Mechanism of Disease. *Biomolecules*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/biom11010075>
- Pinti, M., Gibellini, L., De Biasi, S., Nasi, M., Roat, E., O'Connor, J. E., & Cossarizza, A. (2011). Functional characterization of the promoter of the human Lon protease gene. *Mitochondrion*, 11(1), 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.010>
- Pinti, M., Gibellini, L., Liu, Y., Xu, S., Lu, B., & Cossarizza, A. (2015). Mitochondrial Lon protease at the crossroads of oxidative stress, ageing and cancer. *Cell Mol Life Sci*, 72(24), 4807-4824. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2039-3>
- Pinti, M., Gibellini, L., Nasi, M., De Biasi, S., Bortolotti, C. A., Iannone, A., & Cossarizza, A. (2016). Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions. *Biochim Biophys Acta*, 1857(8), 1300-1306. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.025>
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*, 78, 959-991. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844>
- Puri, N., & Karzai, A. W. (2017). HspQ Functions as a Unique Specificity-Enhancing Factor for the AAA+ Lon Protease. *Mol Cell*, 66(5), 672-683 e674. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.016>
- Quintanilla, R. A., von Bernhardi, R., Godoy, J. A., Inestrosa, N. C., & Johnson, G. V. (2014). Phosphorylated tau potentiates Abeta-induced mitochondrial damage in mature neurons. *Neurobiol Dis*, 71, 260-269. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.016>
- Quiros, P. M., Espanol, Y., Acin-Perez, R., Rodriguez, F., Barcena, C., Watanabe, K., Calvo, E., Loureiro, M., Fernandez-Garcia, M. S., Fueyo, A., Vazquez, J., Enriquez, J. A., & Lopez-Otin, C. (2014). ATP-dependent Lon protease

- controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity. *Cell Rep*, 8(2), 542-556. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.018>
- Rep, M., van Dijl, J. M., Suda, K., Schatz, G., Grivell, L. A., & Suzuki, C. K. (1996). Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science*, 274(5284), 103-106. <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.103>
- Ruan, L., Zhou, C., Jin, E., Kucharavy, A., Zhang, Y., Wen, Z., Florens, L., & Li, R. (2017). Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. *Nature*, 543(7645), 443-446. <https://doi.org/10.1038/nature21695>
- Sahay, D., Terry, M. B., & Miller, R. (2019). Is breast cancer a result of epigenetic responses to traffic-related air pollution? A review of the latest evidence. *Epigenomics*, 11(6), 701-714. <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0158>
- Shahbazian, M. D., & Zoghbi, H. Y. (2002). Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am J Hum Genet*, 71(6), 1259-1272. <https://doi.org/10.1086/345360>
- Shin, M., Watson, E. R., Song, A. S., Mindrebo, J. T., Novick, S. J., Griffin, P. R., Wiseman, R. L., & Lander, G. C. (2021). Structures of the human LONP1 protease reveal regulatory steps involved in protease activation. *Nat Commun*, 12(1), 3239. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23495-0>
- Stauch, K. L., Purnell, P. R., & Fox, H. S. (2014). Aging synaptic mitochondria exhibit dynamic proteomic changes while maintaining bioenergetic function. *Aging (Albany NY)*, 6(4), 320-334. <https://doi.org/10.18632/aging.100657>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci*, 15(10), 655-669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Tai, D. J., Liu, Y. C., Hsu, W. L., Ma, Y. L., Cheng, S. J., Liu, S. Y., & Lee, E. H. (2016). MeCP2 SUMOylation rescues Mecp2-mutant-induced behavioural deficits in a mouse model of Rett syndrome. *Nat Commun*, 7, 10552. <https://doi.org/10.1038/ncomms10552>
- Tao, J., Hu, K., Chang, Q., Wu, H., Sherman, N. E., Martinowich, K., Klose, R. J., Schanen, C., Jaenisch, R., Wang, W., & Sun, Y. E. (2009). Phosphorylation of MeCP2 at Serine 80 regulates its chromatin association and neurological function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(12), 4882-4887. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811648106>
- Tapia-Rojas, C., Cabezas-Opazo, F., Deaton, C. A., Vergara, E. H., Johnson, G. V. W., & Quintanilla, R. A. (2019). It's all about tau. *Prog Neurobiol*, 175, 54-76. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.005>
- Tapia-Rojas, C., Schuller, A., Lindsay, C. B., Ureta, R. C., Mejias-Reyes, C., Hancke, J., Melo, F., & Inestrosa, N. C. (2015). Andrographolide activates the canonical Wnt signalling pathway by a mechanism that implicates the non-ATP competitive inhibition of GSK-3beta: autoregulation of GSK-3beta in vivo. *Biochem J*, 466(2), 415-430. <https://doi.org/10.1042/BJ20140207>
- Tapia-Rojas, C., Torres, A. K., & Quintanilla, R. A. (2019). Adolescence binge alcohol consumption induces hippocampal mitochondrial impairment that persists during the adulthood. *Neuroscience*, 406, 356-368. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.018>

- Telese, F., Ma, Q., Perez, P. M., Notani, D., Oh, S., Li, W., Comoletti, D., Ohgi, K. A., Taylor, H., & Rosenfeld, M. G. (2015). LRP8-Reelin-Regulated Neuronal Enhancer Signature Underlying Learning and Memory Formation. *Neuron*, 86(3), 696-710. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.033>
- Tillotson, R., & Bird, A. (2020). The Molecular Basis of MeCP2 Function in the Brain. *J Mol Biol*, 432(6), 1602-1623. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.10.004>
- Torres, A. K., Jara, C., Llanquinao, J., Lira, M., Cortes-Diaz, D., & Tapia-Rojas, C. (2023). Mitochondrial Bioenergetics, Redox Balance, and Calcium Homeostasis Dysfunction with Defective Ultrastructure and Quality Control in the Hippocampus of Aged Female C57BL/6J Mice. *Int J Mol Sci*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/ijms24065476>
- 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. *Sci Rep*, 11(1), 4448. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83910-w>
- Torres, R. F., Hidalgo, C., & Kerr, B. (2017). Mecp2 Mediates Experience-Dependent Transcriptional Upregulation of Ryanodine Receptor Type-3. *Front Mol Neurosci*, 10, 188. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00188>
- Torres, R. F., & Kerr, B. (2021). Spatial Learning Is Associated with Antagonist Outcomes for DNA Methylation and DNA Hydroxymethylation in the Transcriptional Regulation of the Ryanodine Receptor 3. *Neural Plast*, 2021, 9930962. <https://doi.org/10.1155/2021/9930962>
- Torres, R. F., Kouro, R., & Kerr, B. (2019). Writers and Readers of DNA Methylation/Hydroxymethylation in Physiological Aging and Its Impact on Cognitive Function. *Neural Plast*, 2019, 5982625. <https://doi.org/10.1155/2019/5982625>
- Vaz-Silva, J., Gomes, P., Jin, Q., Zhu, M., Zhuravleva, V., Quintremil, S., Meira, T., Silva, J., Dioli, C., Soares-Cunha, C., Daskalakis, N. P., Sousa, N., Sotiropoulos, I., & Waites, C. L. (2018). Endolysosomal degradation of Tau and its role in glucocorticoid-driven hippocampal malfunction. *EMBO J*, 37(20). <https://doi.org/10.1525/embj.201899084>
- Wang, H. M., Cheng, K. C., Lin, C. J., Hsu, S. W., Fang, W. C., Hsu, T. F., Chiu, C. C., Chang, H. W., Hsu, C. H., & Lee, A. Y. (2010). Obtusilactone A and (-)-sesamin induce apoptosis in human lung cancer cells by inhibiting mitochondrial Lon protease and activating DNA damage checkpoints. *Cancer Sci*, 101(12), 2612-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01701.x>
- Wang, P., Deng, J., Dong, J., Liu, J., Bigio, E. H., Mesulam, M., Wang, T., Sun, L., Wang, L., Lee, A. Y., McGee, W. A., Chen, X., Fushimi, K., Zhu, L., & Wu, J. Y. (2019). TDP-43 induces mitochondrial damage and activates the mitochondrial unfolded protein response. *PLoS Genet*, 15(5), e1007947. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007947>
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(5), 1858-1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>
- Wisdom, N. M., Mignogna, J., & Collins, R. L. (2012). Variability in Wechsler Adult Intelligence Scale-IV subtest performance across age. *Arch Clin Neuropsychol*, 27(4), 389-397. <https://doi.org/10.1093/arclin/acs041>

- Wu, L., Yan, X., Sun, R., Ma, Y., Yao, W., Gao, B., Zhang, Q., You, J., Wang, H., Han, Q., & Sun, X. (2023). Sirt3 restricts tumor initiation via promoting LONP1 deacetylation and K63 ubiquitination. *J Transl Med*, 21(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03925-x>
- Wyss-Coray, T. (2016). Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*, 539(7628), 180-186. <https://doi.org/10.1038/nature20411>
- Xiao, F. H., Wang, H. T., & Kong, Q. P. (2019). Dynamic DNA Methylation During Aging: A "Prophet" of Age-Related Outcomes. *Front Genet*, 10, 107. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00107>
- Yagi, H., Katoh, S., Akitani, I., & Takeda, T. (1988). Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Brain Res*, 474(1), 86-93. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90671-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90671-3)
- Yang, Q., Liu, P., Anderson, N. S., Shpilka, T., Du, Y., Naresh, N. U., Li, R., Zhu, L. J., Luk, K., Lavelle, J., Zeinert, R. D., Chien, P., Wolfe, S. A., & Haynes, C. M. (2022). LONP-1 and ATFS-1 sustain deleterious heteroplasmy by promoting mtDNA replication in dysfunctional mitochondria. *Nat Cell Biol*, 24(2), 181-193. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00840-5>
- Zanini, G., Selleri, V., De Gaetano, A., Gibellini, L., Malerba, M., Mattioli, A. V., Nasi, M., Apostolova, N., & Pinti, M. (2022). Differential Expression of Lonp1 Isoforms in Cancer Cells. *Cells*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/cells11233940>
- Zhang, S., & Mao, Y. (2020). AAA+ ATPases in Protein Degradation: Structures, Functions and Mechanisms. *Biomolecules*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biom10040629>
- Zhou, Z., Hong, E. J., Cohen, S., Zhao, W. N., Ho, H. Y., Schmidt, L., Chen, W. G., Lin, Y., Savner, E., Griffith, E. C., Hu, L., Steen, J. A., Weitz, C. J., & Greenberg, M. E. (2006). Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron*, 52(2), 255-269. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.037>
- Zurita Rendon, O., & Shoubridge, E. A. (2018). LONP1 Is Required for Maturation of a Subset of Mitochondrial Proteins, and Its Loss Elicits an Integrated Stress Response. *Mol Cell Biol*, 38(20). <https://doi.org/10.1128/MCB.00412-17>