

Comparative studies on the physiological adaptation of mitochondria and endoplasmic reticulum to environmental xenobiotics from invertebrate to mammals

Ph.D. Candidate: Mario Alberto Burgos-Aceves

Tutor: Prof. Lilla Lionetti

Abstract

Mitochondria are critical for numerous cellular and biochemical processes. The reciprocal interaction between mitochondria and the endoplasmic reticulum impacts several cellular functions. In cellular and animal models, exposure to a series of pharmaceuticals or environmental pollutants has been shown to alter energy homeostasis resulting in a predisposition to common metabolism-related pathologies. Instead, it has been shown that mitochondria are exquisitely sensitive to environmental stress and act both as a target of stress and the coordinating center for the adaptive cellular response. The present Ph.D. thesis's first aim was to evaluate the dose-dependence effect of the endocrine disruptor DDE, the primary metabolite of DDT, on viability and mitochondrial dynamics in human liver cells (HepG2) *in vitro*, ranging between 0.5 and 100 μM . Its toxic effects on cells could be associated with mitochondrial network impairment associated with an imbalance between mitochondrial fusion and fission processes. Mitochondrial fusion and fission processes are critical to maintain the mitochondrial network and allow the cell to respond to external stressors such as environmental pollutants. Fusion processes are associated with the optimization of mitochondrial function, whereas fission processes are associated with removing damaged mitochondria. Results showed that DDE induced a decrease in cell viability in a dose-dependent manner and enhanced its effects in coinubation conditions with dietary fatty acids. The fusion protein markers Mitofusin 2 (MFN2) and Optical Atrophy 1 (OPA1) exhibited an inverted U-shape dose-response curve, showing the highest content in the 2.5-25 μM DDE dose range. On the other hand, the fission protein marker dynamin-related protein1 (DRP1) was found significantly increased, leading to an increased fission/fusion ratio, with high DDE doses. A similar trend was observed for glucose-regulated protein 75 (GRP75), a chaperon involved in mitochondria-endoplasmic reticulum interaction. Our results suggested that low DDE doses elicited cell adaption stimulating mitochondrial dynamics machinery to counteract the DDE effect. In contrast, high DDE

doses induced cell viability loss associated with mitochondrial dynamics shifts toward fission. The Ph.D. project's second aim was to investigate the potential effect of the pesticides endosulfan and carbofuran on the Mexican marine species *Catarina* scallop by analyzing up-and-down regulation of genes associated with mitochondrial dynamic and endoplasmic reticulum stress. Endosulfan and carbofuran are commonly used in Mexico's agricultural activities with a known endocrine-disruptive action but with different persistence periods. There are reports that both pesticides negatively affect mitochondrial metabolism in mammals, fish, and invertebrates. *Catarina*'s scallop adults were exposed to a non-lethal experimental single dose ($0.45 \mu\text{g L}^{-1}$) for each pesticide, and RT-PCR analyzed the expression of the mitochondrial-associated gene DRP1 and the endoplasmic reticulum-associated gene endoplasmic reticulum interferon stimulator (ERIS). Results showed that endosulfan and carbofuran could upregulate the expression of DRP1 mainly in the gonad. We can infer that they could cause a potential alteration in the reproductive process due to their endocrine disruptive action, encouraging cells to apoptosis. Upregulation of the gene ERIS was observed in the gonad and mantle of scallops exposed to endosulfan. Carbofuran did not affect the DRP1 and ERIS genes expression at this experimental dose. ERIS seems to play a critical role in the activation and regulation of detoxification and immune responses by regulating several cytokines/chemokines synthesis. ERIS overexpression has been associated with type I IFN up-regulation, which triggers some ERIS-dependent inflammatory processes. According to some reports, this can lead to a degree of toxicity that can be fatal in aquatic animals. Therefore, this second aim could provide us a preliminary basis for studying marine bivalves' response to short- and long-term pesticide exposure in terms of regulated gene expression and characterizes new potential genetic markers of environmental contamination. In conclusion, results of the present Ph.D. thesis suggested that in the research field on environmental toxicology and environmental health, it could be essential to further investigate the role of mitochondria and mitochondria-Endoplasmic reticulum interaction both in humans and wildlife to shed light on the cellular mechanisms involved in adaptive response and/or toxicity of the environmental pollutants. Moreover, present results are helpful to clarify the mechanisms underlying the cell fate towards survival or death in response to increasing doses of environmental pollutants.

Studio comparativo dell'adattamento fisiologico di mitocondri e reticolo endoplasmatico a xenobiotici ambientali dagli invertebrati ai mammiferi.

Riassunto

I mitocondri sono fondamentali per numerosi processi cellulari e biochimici. L'interazione reciproca tra i mitocondri e il reticolo endoplasmatico influisce su diverse funzioni cellulari. In modelli cellulari e animali, l'esposizione a una serie di farmaci o inquinanti ambientali ha dimostrato di alterare l'omeostasi energetica con conseguente predisposizione a patologie legate al metabolismo. Infatti, è stato dimostrato che i mitocondri sono molto sensibili allo stress ambientale e agiscono sia come bersaglio dello stress che come centro di coordinamento per la risposta cellulare adattativa. Il primo scopo della presente tesi di dottorato è stato quello di valutare l'effetto dose-dipendente del distruttore endocrino DDE, il metabolita primario del DDT, sulla vitalità e sulla dinamica mitocondriale nelle cellule epatiche umane (HepG2) *in vitro*, utilizzando un vasto range di dosi di DDE comprese tra 0,5 e 100 μM . I suoi effetti tossici sulle cellule potrebbero essere collegati alla compromissione della rete mitocondriale associata a uno squilibrio tra processi di fusione e fissione mitocondriale. I processi di fusione e fissione mitocondriale sono fondamentali per mantenere la rete mitocondriale e consentire alla cellula di rispondere a fattori di stress esterni come gli inquinanti ambientali. I processi di fusione sono associati all'ottimizzazione della funzione mitocondriale, mentre i processi di fissione sono associati alla rimozione dei mitocondri danneggiati. I risultati hanno mostrato che il DDE induce una diminuzione della vitalità cellulare in modo dose-dipendente e ne potenzia gli effetti in condizioni di co-incubazione con gli acidi grassi tipicamente presenti negli alimenti. Le proteine marker dei processi di fusione, Mitofusin 2 (MFN2) and Optical Atrophy 1 (OPA1) hanno mostrato una curva dose-risposta a forma di U-invertita, raggiungendo il massimo incremento nell'intervallo di dose DDE 2,5-25 μM . D'altra parte, la proteina correlata alla fissione mitocondriale (DRP1) aumenta anche a dosi elevate di DDE inducendo un aumento del rapporto fissione/fusione a tali dosi. Una tendenza simile è stata osservata per la proteina 75 regolata dal glucosio (GRP75), uno chaperone coinvolto nell'interazione mitocondri-reticolo endoplasmatico. I risultati di questa tesi suggeriscono che basse dosi di DDE inducono l'adattamento cellulare stimolando il meccanismo della dinamica mitocondriale per

contrastare l'effetto del DDE. Al contrario, alte dosi di DDE inducono la perdita di vitalità cellulare associata a dinamiche mitocondriali che si spostano verso la fissione. Il secondo scopo del progetto di dottorato è stato quello di studiare il potenziale effetto dei pesticidi endosulfano e carbofurano sulla specie marina messicana *Catarina scallop*, analizzando la up e down regulation dei geni associati alla dinamica mitocondriale e allo stress del reticolo endoplasmatico. Endosulfano e carbofurano sono comunemente usati nelle attività agricole del Messico con una nota azione di disturbo endocrino ma con periodi di persistenza differenti. Ci sono rapporti secondo cui entrambi i pesticidi influenzano negativamente il metabolismo mitocondriale nei mammiferi, nei pesci e negli invertebrati. Gli adulti di *Catarina scallop* sono stati esposti a una singola dose sperimentale non letale ($0,45 \mu\text{g L}^{-1}$) di ciascun pesticida e sono state effettuate RT-PCR per analizzare l'espressione del gene associato ai mitocondri DRP1 e dello stimolatore dell'interferone del reticolo endoplasmatico associato al gene endoplasmatico (ERIS). I risultati hanno mostrato che endosulfano e carbofurano potrebbero sovra-regolare l'espressione di DRP1 principalmente nella gonade. Possiamo dedurre che potrebbero causare una potenziale alterazione del processo riproduttivo a causa della loro azione di distruttore endocrino, stimolando l'apoptosi cellulare. La sovra-regolazione del gene ERIS è stata osservata nella gonade e nel mantello delle capesante esposte all'endosulfano. Il carbofurano non ha influenzato l'espressione dei geni DRP1 ed ERIS a questa dose sperimentale. L'ERIS sembra giocare un ruolo critico nell'attivazione e regolazione dei processi di detossificazione e delle risposte immunitarie regolando la sintesi di diverse citochine / chemochine. La sovra-espressione di ERIS è stata associata all'aumento dell'IFN di tipo I, che innesca alcuni processi infiammatori dipendenti da ERIS. Secondo alcuni studi, ciò può portare a un grado di tossicità che può essere fatale per gli animali acquatici. Pertanto, questo secondo scopo della tesi potrebbe fornire una base preliminare per studiare la risposta dei bivalvi marini all'esposizione a breve e lungo termine ai pesticidi in termini di regolazione dell'espressione genica e potrebbe portare alla caratterizzazione di nuovi potenziali marcatori genetici di contaminazione ambientale. In conclusione, i risultati del presente tesi di dottorato di ricerca suggeriscono che nel campo della ricerca sulla tossicologia e salute ambientale, potrebbe essere essenziale indagare ulteriormente il ruolo dei mitocondri e dell'interazione mitocondri-reticolo endoplasmatico sia nell'uomo che nella fauna selvatica per fare luce sui meccanismi cellulari coinvolti nella

risposta adattativa e/o tossicità degli inquinanti ambientali. Inoltre, i risultati attuali sono utili per chiarire i meccanismi che sono alla base del destino cellulare in termini di sopravvivenza o morte cellulari in risposta a dosi crescenti di inquinanti ambientali.