



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula



FORMACIÓN DE AGRESOMAS EN CARDIOMIOCITOS EXPUESTOS A DISTINTOS TIPOS DE ESTRÉS CELULAR

Directores de memoria:

Dr. Sergio Lavandero G.
Bqco. Paola Marambio M.
Depto. Bioquímica y Biología
Molecular, FONDAP CEMC
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de
Chile.

Profesor Patrocinante:

Dr. Sergio Lavandero G.
Depto. Bioquímica y Biología
Molecular, FONDAP CEMC,
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de
Chile.

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

CARLOS JOAQUÍN SANHUEZA MUÑOZ

Santiago, 2006

ÍNDICE

	Página
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
RESUMEN	6
SUMMARY	8
ABREVIATURAS	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. El sistema ubiquitina-proteosoma	11
1.2. Modificaciones mediadas por ubiquitina	14
1.3. Proteosoma	14
1.4. Agregados proteicos	16
1.5. Evidencias de autofagia, agregados de proteínas poliubiquitinadas y agresomas en el corazón.	19
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVO GENERAL	21
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Reactivos	22
5.2. Material biológico	22
5.2.1. Obtención del cultivo primario de cardiomiocitos neonatos	23
5.2.2. Cultivo de células HEK293	23
5.3. Condiciones de estrés utilizadas	23
5.4. Inhibidores farmacológicos utilizados	24
5.5. Inmunofluorescencia Indirecta	24
5.6. Preparación de los extractos de proteínas totales	25
5.7. Obtención de fracciones citosólicas y nucleares	25
5.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida	26
5.9. Electrotransferencia de proteínas	26
5.10. Western blot (WB)	26
5.11. Determinación de la actividad del proteosoma	27
5.12. Transducción adenoviral del gen LC3-GFP.	27
5.13. Determinación de los niveles de proteínas poliubiquitinadas en fracciones solubles e insolubles a Triton X-100.	28
5.14. Análisis estadístico	28
6. RESULTADOS	
6.1. Determinación de los niveles de las proteínas poliubiquitinadas, enzima activadora de Ubiquitina (E1a/E1b) y enzima conjugadora de Ubiquitina (E2 25 kDa).	29
6.2. Visualización de proteínas poliubiquitinadas mediante	

microscopía confocal.	37
6.3. Distribución subcelular del proteosoma	37
6.4. Determinación de la actividad similar a quimotripsina del proteosoma	41
6.5. Disrupción de los microtúbulos	43
6.6. Centro organizador de los microtúbulos en el cardiomiocito	43
6.7. Agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas y Hsp70	44
6.8. Agresomas y autofagia	47
6.8.1. Colocalización de agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas con Rab24.	47
6.8.2. Colocalización de agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas con LC3-GFP	48
6.8.3. Efecto de 3-metiladenina en el nivel de proteínas poliubiquitinadas y en los agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas.	49
6.9. Inhibición del proteosoma y agresomas	57
6.10. Agresomas, proteosoma y Autofagia	60
7. DISCUSIÓN	62
7.1. El sistema ubiquitina proteosoma en el cardiomiocito	62
7.2. Formación de agresomas en el cardiomiocito	65
7.3. Relación proteosoma-autofagia-agresoma	66
7.4. Perspectivas en el estudio de agresomas en el cardiomiocito: La viabilidad celular.	71
8. CONCLUSIONES	73
9. BIBLIOGRAFÍA	74
10. ANEXOS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ubiquitina y su sistema enzimático de conjugación	13
Figura 2: Estructura del proteosoma 26S y degradación de proteínas	16
Figura 3: Modelo de formación de agresomas.	18
Figura 4.1: Cuantificación por densitometría de proteínas poliubiquitinadas	31
Figura 4.2: WB representativos del nivel de las proteínas poliubiquitinadas	32
Figura 5.1: Cuantificación por densitometría de los niveles de la enzima activadora de ubiquitina E1a/E1b	33
Figura 5.2: WB representativos del nivel de la enzima activadora de ubiquitina E1a/E1b	34
Figura 6.1: Cuantificación por densitometría de los niveles de la enzima conjugadora de ubiquitina E2 (25 kDa).	35
Figura 6.2: WB representativos del nivel de la enzima conjugadora de Ubiquitina E2 (25 kDa).	36
Figura 7: Visualización de proteínas poliubiquitinadas en células fijadas	38
Figura 8.1: Distribución subcelular del proteosoma	39
Figura 8.2: Distribución subcelular del proteosoma en células fijadas	40
Figura 9: Determinación de la actividad similar a quimotripsina	42
Figura 10: Efecto de la disrupción de los microtúbulos en la formación de agresomas	45
Figura 11: Distribución subcelular del centro organizador de microtúbulos	45
Figura 12: Colocalización de proteínas poliubiquitinadas con Hsp70 en el cardiomiocito	46
Figura 13: Expresión de Rab24 en cardiomiocitos	50
Figura 14: Colocalización de agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas con Rab24	51-53
Figura 15: Colocalización de agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas con vesículas autofágicas	54
Figura 16: Efecto de 3-metiladenina sobre el nivel de las proteínas poliubiquitinadas en fracciones solubles e insolubles a Tritón X-100.	55
Figura 17: Efecto de 3-metiladenina (10 mM) en la formación de agresomas	56
Figura 18: Efecto de la inhibición del proteosoma con MG132 en la	

formación de agresomas	58
Figura 19: Efecto de la inhibición del proteosoma con Lactacistina en la formación de agresomas	59
Figura 20: Efecto de la inducción de la autofagia en la depuración de agresomas	61
Figura 21: Condiciones de estrés favorecen la aparición de agresomas en cardiomiocito.	70

RESUMEN

El metabolismo proteico es altamente regulado. Los eucariontes poseen diferentes sistemas degradativos como lisosomas y el sistema ubiquitina/proteosoma. Este último, responsable de la degradación de más del 80% de las proteínas intracelulares, regula una amplia gama de procesos intracelulares. Alteraciones en este sistema han sido observadas en enfermedades neurodegenerativas, detectándose acumulación de agregados de proteínas poliubiquitinadas. Las células evitan la acumulación de estos agregados mediante su degradación por el proteosoma y autofagia. Sin embargo, una vez formados, estos cuerpos son refractarios a la proteólisis y se acumulan en agresomas (cuerpos de inclusión asociados a microtúbulos). Recientemente, amplios depósitos proteicos se han detectado en enfermedades cardíacas, aún cuando el papel del sistema ubiquitina/proteosoma no ha sido dilucidado.

El objetivo de esta memoria fue investigar qué efecto producen diferentes condiciones de estrés celular, asociados a procesos de isquemia cardíaca como privación de glucosa, estrés hiperosmótico mediado por sorbitol, privación de aminoácidos y suero, sobre el sistema ubiquitina/proteosoma en cardiomiocitos.

Estudios de inmunofluorescencia mostraron la formación de agregados proteicos poliubiquitinados, distribuidos ampliamente en el citoplasma, y después de 18 h post tratamiento se observaron grandes agregados proteicos, concentrados en estructuras tipo agresomas, orientados a un lado de la zona perinuclear. La aparición de estas estructuras no se debió a un incremento en el nivel de las proteínas poliubiquitinadas (excepto en células privadas de glucosa) o a una alteración del sistema enzimático de conjugación de ubiquitina o inhibición del proteosoma. La desorganización de los microtúbulos con Vinblastina y colocalización con Hsp70 confirmó que estas estructuras correspondían a agresomas. Además, los agresomas colocalizaron con Rab24, una GTPasa pequeña implicada en autofagia, y con la proteína LC3-GFP, confirmando una estrecha relación entre agresomas y la autofagia. Resultados similares se encontraron al utilizar inhibidores del proteosoma. Finalmente, la inducción de la autofagia con rapamicina facilitó la remoción de los agresomas.

En conclusión, condiciones de estrés celular inducen la formación de agresomas en cardiomiocitos. La formación de agresomas no es dependiente de la inhibición del proteosoma o a una alteración en el sistema enzimático de conjugación de la ubiquitina y la inducción de la autofagia facilitó su remoción.

SUMMARY

“AGGRESOME FORMATION IN CARDIOMYOCYTES UNDER DIFFERENT STRESS CONDITIONS”.

Protein metabolism is highly regulated. Eukaryotic cells have two main degradative systems: lysosomes and ubiquitin-proteasome system (UPS). UPS is responsible over 80% intracellular protein degradation and regulates many cellular processes. Alterations in this system has been reported in neurodegeneratives disorders in which polyubiquitin protein aggregates were detected. Cells can avoid protein aggregate accumulation by degradation through UPS or autophagy. Nevertheless, once aggregate accumulates, they are refractory to proteolytic degradation and then tend to accumulate in aggresomes (microtubules-associated inclusion bodies). These protein deposits have been recently detected in cardiovascular diseases, although the precisely role of UPS remains unclear.

The aim of this work was to determine the effects of several cardiac ischemia-related stress conditions such us glucose deprivation, hyperosmotic stress mediated by sorbitol, starvation and serum deprivation on the UPS in cultured neonatal rat cardiomyocytes.

Poly-ubiquitin protein immunofluorescence detection showed that the four treatments induced the deposit of polyubiquitin-protein aggregates widely distributed in the cytoplasm. After 18 h post treatment, highly concentrated polyubiquitin-protein deposits in aggresome-like structures in the perinuclear zone were detected. The formation of these structures was independent to the level of polyubiquitin-protein increase (except in glucose deprived cells) or changes in enzymatic ubiquitin-conjugating system or proteasome activity inhibition. Vinblastine-dependent microtubules disruption and colocalization with Hsp70 confirmed that these structures were aggresomes. Moreover, we observed aggresome colocalization with Rab24, a small GTPase implicated in autophagy and GFP-LC3. This last result suggest a link between aggresomes and autophagy. Similar results were observed in proteasome inhibited cells. Autophagy induction with rapamycin facilitated aggresome remotion.

In summary, stress conditions induce aggresome formation in primary cultures of cardiac myocytes, being this process independent of proteasome inhibition or alteration in ubiquitin-conjugating system. Autophagy induction facilitated aggresome remotion in these cells.

ABREVIATURAS

ATP	adenosin trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
E1	enzima activadora de ubiquitina
E2	enzima conjugadora de ubiquitina
E3	enzima ubiquitina ligasa
EDTA	etilendiamino tetra acetato
FBS	suero fetal bovino
FCS	suero fetal de ternera
h	horas
HDAC 6	histona deacetilasa 6
kDa	kilodaltons
MDa	megadaltons
mg	miligramos
mL	mililitros
mRNA	RNA mensajero
min	minutos
ng	nanogramos
PBS	tampón fosfato salino
pfu	partículas formadoras de unidades
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
rpm	revoluciones por minuto
SLB	Laemmli buffer solution (Tampon de Laemmli)
Tor quinasa	Target of Rapamycin (blanco de rapamicina)
μg	microgramos
μL	microlitros
μm	micrometros
WB	western blot

1. INTRODUCCIÓN

El metabolismo proteico es regulado tanto a nivel de la biosíntesis como de la degradación. Los eucariontes están equipados con diferentes sistemas degradativos: proteasas mitocondriales, lisosomas y el sistema ubiquitina–proteosoma, siendo este último el encargado de degradar la gran mayoría de las proteínas de vida media corta y también aquellas proteínas anómalas. Dado que el sistema ubiquitina–proteosoma degrada más del 80 al 90% de las proteínas intracelulares, se le considera como el principal sistema de degradación proteica (Herrmann et al., 2004). Este sistema participa en una amplia gama de procesos celulares, como la división y ciclo celular, regulación de factores transcripcionales y en el control de calidad a nivel celular, por lo que no es sorprendente que aberraciones en este sistema estén implicadas en desórdenes neurodegenerativos (Ciechanover, 2005), en los cuales se han encontrado inclusiones de proteínas poliubiquitinadas que comprometen la funcionalidad neuronal (Ciechanover and Schwartz, 2004). También una serie de trabajos han destacado la presencia de depósitos de agregados de proteínas poliubiquitinadas en la cardiomiopatía tanto dilatada como isquémica (Elsasser et al., 2004; Knaapen et al., 2001; Kostin et al., 2003; Sanbe et al., 2004; Weekes et al., 2003).

Nuestro laboratorio se ha concentrado en investigar los mecanismos de muerte del cardiomiocito, ya que su pérdida es responsable de varias enfermedades cardíacas. La presencia de agregados de poliubiquitina en muestras cardíacas patológicas permite iniciar una nueva línea de investigación que busca conocer el papel del sistema ubiquitina–proteosoma en el cardiomiocito.

1.1. El sistema ubiquitina-proteosoma

Como funciones generales del sistema ubiquitina–proteosoma están la degradación de proteínas de vida media corta, regulación del ciclo celular, reparación del DNA, transducción de señales, endocitosis, apoptosis y la respuesta inmune (Passmore and Barford, 2004).

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos, estable al calor, que presenta una expresión ubicua, de ahí su nombre. Esta proteína está altamente conservada en la evolución y en las especies, a excepción de los procariontes que no la expresan (Ciechanover, 2005;Glickman and Ciechanover, 2002). La ubiquitina se sintetiza como precursor que debe ser procesado por enzimas de desubiquitinación para generar secuencias glicina-glicina en el extremo C-terminal, que son el sitio de unión a sus proteínas blanco (Schwartz and Hochstrasser, 2003). La ubiquitina procesada se une a una proteína blanco por un puente isopeptídico entre una glicina en el COOH-terminal de la ubiquitina y con el amino en posición ϵ de una lisina interna de la proteína blanco (Ciechanover, 2005;Dong et al., 2004;Glickman and Ciechanover, 2002;Passmore and Barford, 2004;Schwartz and Hochstrasser, 2003), o bien, la ubiquitina forma el enlace isopeptídico con el grupo amino terminal de una proteína blanco (Ciechanover, 2005;Dong et al., 2004;Glickman and Ciechanover, 2002;Passmore and Barford, 2004;Schwartz and Hochstrasser, 2003;Ciechanover and Ben Saadon, 2004). La conjugación de la ubiquitina a una proteína blanco es catalizada por una serie de reacciones enzimáticas que se presentan en la [Figura 1](#). En primer término, la enzima activadora de ubiquitina E1 adenila el COOH-terminal de la ubiquitina, formando un puente tioléster con una cisteína del sitio catalítico de E1. Para ser totalmente activo, E1 debe unir no covalentemente un grupo adenilato a una segunda ubiquitina. Luego, la ubiquitina unida al tioléster se transfiere desde E1 hacia un residuo de cisteína presente en el sitio activo de E2, enzima conjugadora de ubiquitina donde es nuevamente unida mediante una unión tioléster. E2 puede transferir directamente ubiquitina al sustrato previamente unido a la enzima E3, o ubiquitina ligasa, y sintetizar una cadena de poliubiquitina o bien, transferir la ubiquitina activada a E3. Por su parte, E3 transloca la ubiquitina hacia el sustrato previamente unido a él y E2 realiza la síntesis de una cadena de poliubiquitina (Glickman and Ciechanover, 2002;Passmore and Barford, 2004).

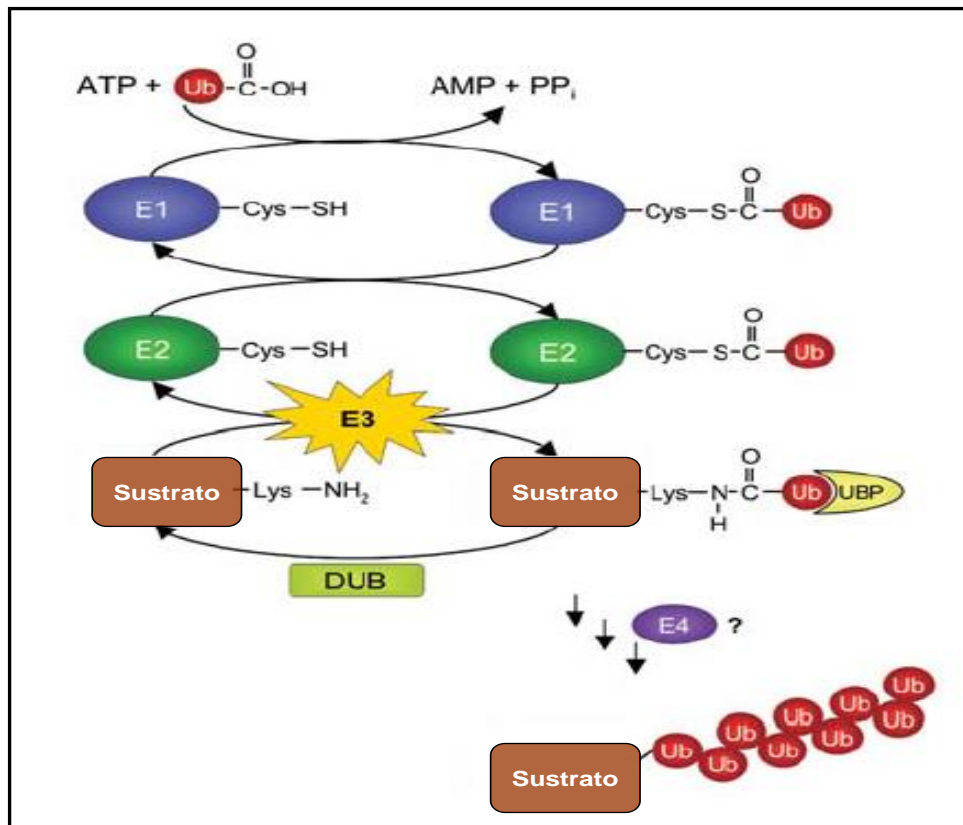


Figura 1: Ubiquitina y su sistema enzimático de conjugación

La ubiquitina se une covalentemente a la proteína sustrato mediante tres etapas en las que secuencialmente participan E1, E2 y E3. La adición de múltiples unidades de ubiquitina por E3, probablemente con la ayuda de una enzima E4 resulta en la formación de una cadena de poliubiquitina. La ubiquitina puede ser removida por enzimas de deubiquitinación (DUB). Esta imagen fue modificada de [Passmore and Bradford, 2004](#).

Existe sólo una enzima E1 en eucariontes ([Glickman and Ciechanover, 2002](#); [Passmore and Barford, 2004](#)) que se presenta como dos isoformas (E1a/E1b) ([Cook and Chock, 1995](#)). Por otro lado, existen entre 10 a 30 enzimas E2, que son consideradas limitantes del proceso de ubiquitinación de proteínas ([Rajapurohitam et al., 2002](#)). Con respecto a las enzimas E3, se estima que existen más de cien, que otorgan la selectividad al sistema, reconociendo proteínas anómalas, mal plegadas, mutadas, además del reconocimiento de secuencias específicas o degrones ([Glickman and Ciechanover, 2002](#); [Passmore and Barford, 2004](#); [Pickart and Eddins, 2004](#)). La interacción E3-sustrato es regulada mediante modificaciones a nivel del sustrato, tales como fosforilación, glicosilación, acetilación e hidroxilación, facilitando así el reconocimiento del sustrato por una ubiquitina ligasa específica ([Pickart and Eddins, 2004](#)).

1.2. Modificaciones mediadas por ubiquitina

La ubiquitina posee en su estructura 6 residuos lisinas de importancia, de los que se han descritos modificaciones dependiendo del residuo sobre el cual se adicionan nuevas unidades de ubiquitina. Las modificaciones mediadas por ubiquitina son la poli y monoubiquitinación. La monoubiquitinación ha sido relacionada en diversas funciones celulares como la regulación de las histonas, endocitosis y tráfico a través de membranas (Hicke, 2001; Passmore and Barford, 2004). Por otro lado, existen dos tipos de poliubiquitinación con consecuencias totalmente distintas. La adición de al menos 3 residuos de ubiquitina en lisina 48 es una señal que indica degradación proteica a través del proteosoma. Además, el anclaje de la cadena de poliubiquitina a residuos de lisinas en posiciones 11 ó 29 marca a la proteína para ser degradada en el proteosoma. Por el contrario, la adición de una cadena de poliubiquitina a las lisinas en posiciones 6 ó 63 no involucra la degradación de la proteína a través del proteosoma, sino que se relaciona a eventos reversibles como cambios en la actividad de proteínas, ubicación subcelular o interacción proteína-proteína. Estos dos residuos lisinas pueden ser aceptores de cadenas de poliubiquitina o funcionar como sitios de monoubiquitinación (Passmore and Barford, 2004).

1.3. Proteosoma

El proteosoma es un complejo multiproteico, también conocido como proteosoma 26S, formado por 50 subunidades proteicas que posee una masa molecular de alrededor de 2,5 MDa y su función principal es degradar proteínas. Este complejo es altamente conservado en los eucariontes y se subdivide en proteosoma 20S o centro proteolítico y proteosoma 19S o subunidad reguladora (ver [Figura 2A](#)). El proteosoma 20S está formado por 4 anillos heptaméricos (2 anillos α externos y 2 anillos β internos) que forman una estructura semejante a un cilindro (ver [Figura 2A](#)) (Glickman and Ciechanover, 2002; Wolf and Hilt, 2004). El proteosoma 20S posee tres actividades proteolíticas residentes en su interior en 3 diferentes subunidades: β_5 con actividad similar a quimotripsina, β_2 con actividad similar a tripsina y la actividad péptido peptidil-glutamil (β_1) (Glickman and Ciechanover, 2002; Wolf and Hilt, 2004; Johnston and Madura, 2004).

Por otro lado, la subunidad 19S presenta múltiples papeles en la regulación de la actividad del proteosoma, seleccionando sustratos, preparándolos para su degradación, translocándolos dentro del 20S y probablemente influenciando la naturaleza de los productos generados por el 20S (Glickman and Ciechanover, 2002). Los sustratos son reconocidos mediante la cadena de poliubiquitina, donde ésta se une a la subunidad 19S. Como el acceso al interior del proteosoma 20S está físicamente ocluido por subunidades α específicas, el proteosoma 20S no degrada proteínas ubiquitinadas, entonces el sustrato es desplegado, mediante una serie de 6 ATPasas (Glickman and Ciechanover, 2002; Johnston and Madura, 2004) residentes en la base de la subunidad 19S y la proteína sustrato ya desplegada es translocada a través del poro a la cámara de la subunidad 20S (Wolf and Hilt, 2004). Las proteínas desplegadas acceden a la cámara catalítica desde el extremo de las subunidades α , que en ausencia de activadores, este “poro” permanece cerrado y su actividad reprimida (Rechsteiner and Hill, 2005). Durante la translocación de la proteína, la cadena de poliubiquitina es removida por acción de enzimas de desubiquitinación (Wolf and Hilt, 2004) (ver [Figura 2B](#)) y la proteína sustrato es hidrolizada a péptidos más pequeños y aminoácidos los que pueden escapar del sitio catalítico a través de pequeños poros presentes en la pared del 20S proteosoma (Johnston and Madura, 2004).

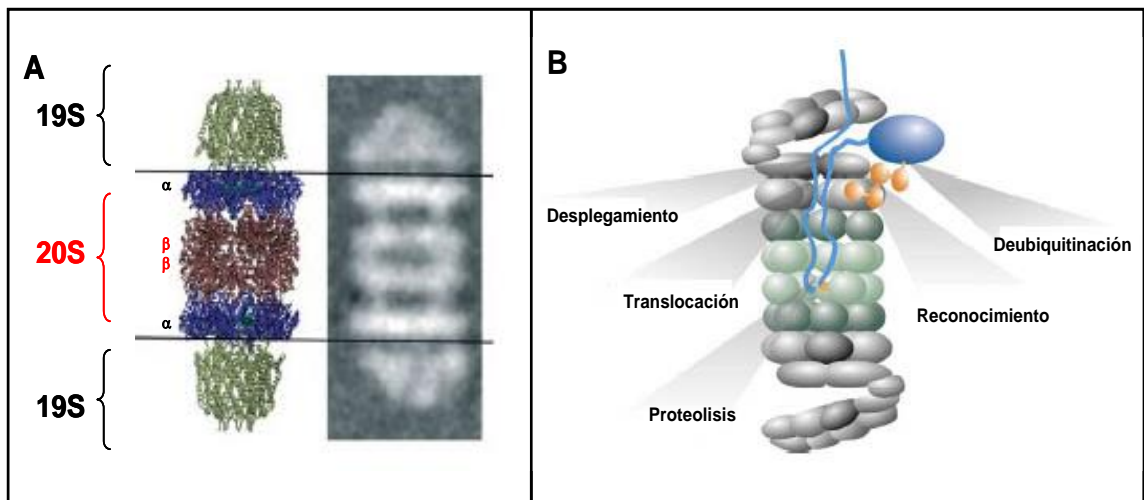


Figura 2: Estructura del proteosoma 26S y degradación de proteínas. En **A** se presenta la estructura cristalina del proteosoma 26S (izquierda) y, a la derecha, se presenta una microfotografía de tinción negativa del proteosoma bovino. Se indican las subunidades 19S y el centro proteolítico 20S. En la subunidad 20S de la figura se destacan la conformación que posee el heptamero de subunidades α y β . Esta imagen fue modificada de [Rechsteiner and Hill 2005](#). En **B** se presenta el proceso de reconocimiento y degradación de un sustrato, por parte del proteosoma 26S. Primero, el sustrato es reconocido por su cadena de poliubiquitina, esta cadena se remueve por la acción de enzimas de deubiquitinación. Posteriormente, ocurre el desplegamiento de la proteína, la translocación a través del poro y la proteólisis del sustrato por acción de subunidades β específicas del proteosoma 20S. Esta imagen fue modificada de [Wolf and Hilt 2004](#).

1.4. Agregados proteicos

La acumulación de conjugados de ubiquitina y/o cuerpos de inclusión con ubiquitina han sido descritos como la antesala de una serie de enfermedades neurodegenerativas ([Ciechanover and Schwartz, 2004](#)). Recientemente, depósitos de proteínas poliubiquitinadas han sido hallados en biopsias de pacientes humanos que sufren de cardiomiopatía dilatada ([Kostin et al., 2003](#); [Weekes et al., 2003](#)), corazón humano hibernante ([Elsasser et al., 2004](#)), cardiomiopatía diabética e isquémica ([Knaapen et al., 2001](#)) y en modelos animales de cardiomiopatía ([Sanbe et al., 2004](#)).

Los cuerpos de inclusión corresponden a un foco intracelular de agregados proteicos, que poseen una baja solubilidad en solventes acuosos o detergentes, que se presentan en bajo número de copias (usualmente uno por célula) en el centro organizador de microtúbulos, también conocido como centrosoma el que está enriquecido con componentes del sistema ubiquitina-proteosoma y proteínas chaperonas como Hsp70 y Hsp90 ([Wigley et al., 1999](#)). Se ha descrito que la

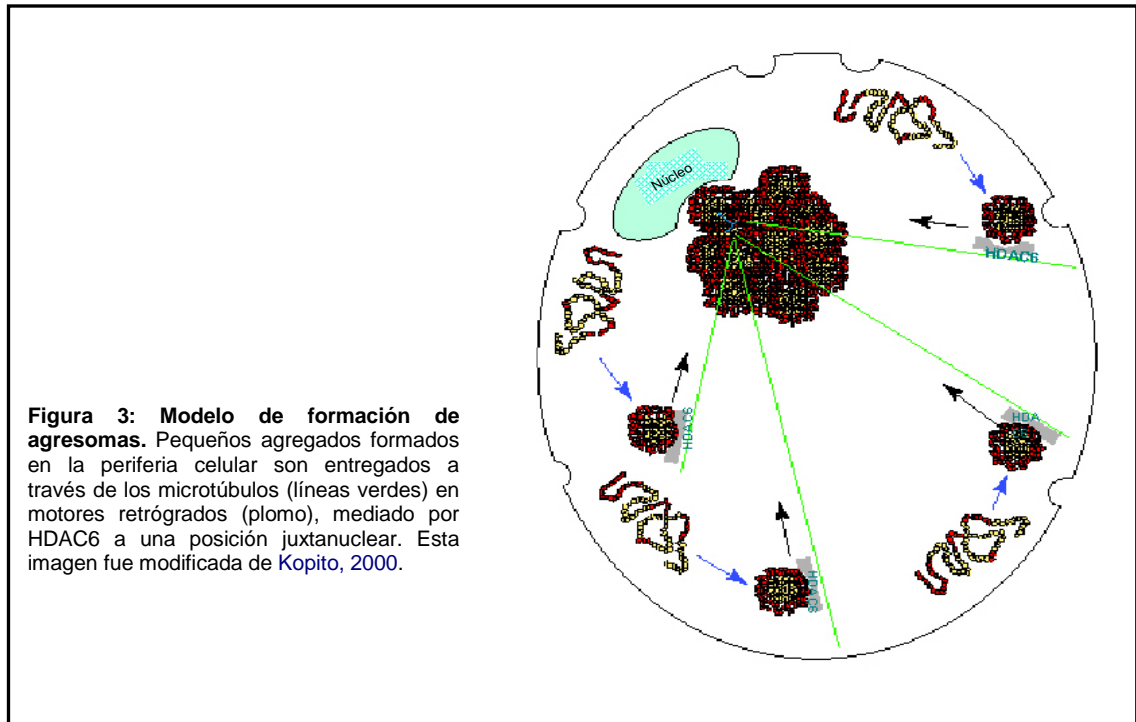
formación de cuerpos de inclusión ocurre cuando la capacidad degradativa del proteosoma se ve excedida (Johnston et al., 1998;Kopito, 2000).

El fenómeno de agregación nace de la interacción entre los residuos hidrofóbicos de oligómeros con el medio acuoso presente en el citoplasma. Los residuos hidrofóbicos van a interactuar del tal forma de protegerse de las condiciones adversas del medio intracelular formando un agregado que es más estable que el conformero intermediario del que derivan. Así, el destino final de una proteína mal plegada estará determinado por las cinéticas de degradación a través del proteosoma y la agregación en oligómeros de alto peso molecular. Para degradar sustratos mal plegados eficientemente, el proteosoma debe ganar la competencia por el sustrato antes de que éste se agregue. Es así que se establece un fino equilibrio entre la degradación a través del proteosoma y el proceso de agregación (Kopito, 2000).

En la actualidad existen dos modelos que explican la formación de cuerpos de inclusión. En uno la agregación proteica de monómeros ocurre directamente en el cuerpo de inclusión y, en el otro, que es representado en la [Figura 3](#), los cuerpos de inclusión se forman como un agregado de agregados más pequeños (Kopito, 2000).

Cuando la formación de cuerpos de inclusión es dependiente de microtúbulos se les denomina agresomas (Johnston et al., 1998;Kopito, 2000). Éstos están formados por un conjunto de proteínas mal plegadas, poliubiquitinadas que son capaces de secuestrar componentes del sistema ubiquitina-proteosoma, múltiples proteínas chaperonas (Kopito, 2000) y además cambian la distribución de los filamentos intermedios, entorno a ellos (Harada et al., 2003;Johnston et al., 1998). Existen agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas (Johnston et al., 1998) y otros que no poseen (García-Mata et al., 1999;Johnston et al., 2000).

El transporte retrógrado de los agresomas a través de los microtúbulos es mediado por la proteína histona deacetilasa 6 (HDAC6), la que es capaz de unir una proteína pro-agregante poliubiquitinada a un motor de dineína y realizar el viaje por los microtúbulos. La pérdida de HDAC6 impide el reclutamiento, la depuración de los agregados proteicos y la formación del agresoma (Kawaguchi et al., 2003).



Hasta la fecha, el estudio de los agresomas se ha llevado a cabo en líneas celulares sobreexpresando una proteína en particular, prototipo silvestre o una forma mutante de ésta, relacionada a una patología. Estas proteínas sobreexpresadas tienen la propiedad de ser altamente hidrofóbicas, por lo que presentan una tendencia natural a agregarse lo que se ve facilitado con la inhibición del proteosoma.

Por otro lado, la autofagia es la principal vía de tráfico para la degradación de componentes celulares hacia los lisosomas ([Wang and Klionsky, 2003](#); [Yoshimori, 2004](#)). El material citoplasmático es secuestrado a través de una estructura de doble membrana que da origen al autofagosoma, que a través de una serie de pasos se fusiona con los lisosomas para dar origen al autofagolisosoma y el contenido vacuolar es digerido y reciclado ([Klionsky and Emr, 2000](#); [Petiot et al., 2002](#); [Wang and Klionsky, 2003](#); [Yoshimori, 2004](#)). La formación del autofagosoma depende de dos sistemas de conjugación esenciales, similares al de ubiquitina (ubiquitin-like system), como lo son Atg12-Atg5 y Atg8/LC3 ([Ohsumi, 2001](#); [Schwartz and Hochstrasser, 2003](#)). Además, la maduración de vesículas autofágicas requiere de la enzima activadora de ubiquitina (E1) ([Schwartz et al.,](#)

1992). La autofagia es inducida por condiciones de estrés tales como la privación de aminoácidos, hipoxia, acumulación de organelos y proteínas dañadas (Petiot et al., 2002) y la privación de glucosa (Aki et al., 2003). La inhibición de TOR quinasa por rapamicina también induce autofagia (Klionsky and Emr, 2000;Petiot et al., 2002;Wang and Klionsky, 2003;Yoshimori, 2004). Además la inducción de la autofagia produce dramáticos cambios en la distribución de Rab24 hacia los autofagosomas y su papel en procesos autofágicos no está del todo dilucidado (Munafó and Colombo, 2002).

Se ha reportado que células de Schwann tienen la capacidad de eliminar agresomas mediante la activación de la autofagia (Fortun et al., 2003). La autofagia también es responsable de la disolución de inclusiones neuronales de ubiquitina (Rideout et al., 2004) y es esencial para la remoción de agregados de la proteína Huntingtina en el citoplasma y produce el reclutamiento de los sistemas ATG hacia los agresomas (Iwata et al., 2005a) .

Recientemente se ha demostrado que HDAC-6 es esencial para el transporte retrógrado de los autofagosomas, para el reclutamiento de LC3 hacia los agresomas y para mantener en una posición pericentriolar a los lisosomas. Además inhibidores del proteosoma incrementan los autofagosomas positivos para LC3 y ATG12 (Iwata et al., 2005b)

1.5. Evidencias de autofagia, agregados de proteínas poliubiquitinadas y agresomas en el corazón.

El nacimiento es la etapa donde se experimenta el mayor ayuno fisiológico, el corazón es uno de los órganos que experimenta en mayor grado autofagia (Kuma et al., 2004).

Además la autofagia se activa en diversas condiciones patológicas como son isquemia cardiaca (Yan et al., 2005), cardiomiopatía dilatada (Kostin et al., 2003;Weekes et al., 2003), corazón hibernante (Elsasser et al., 2004), cardiomiopatía isquémica (Knaapen et al., 2001;Weekes et al., 2003). En varias de ellas existen depósitos de agregados de proteínas poliubiquitinadas. Más aún,

cardiomiocitos con grandes depósitos de proteínas poliubiquitinadas son positivos para marcadores de la autofagia (Elsasser et al., 2004;Kostin et al., 2003).

Nuestro laboratorio recientemente ha demostrado que la autofagia es inducida en el cardiomiocito bajo distintas formas de estrés celular relacionados a procesos de isquemia cardiaca, tales como privación de glucosa, estrés hiperosmótico, privación de aminoácidos y de suero, a contar de las 2h de tratamiento. La privación de glucosa produjo la mayor activación de la autofagia y ésta fue reversible hasta las 2h en todos los casos, a excepción de la privación de glucosa cuyo desarrollo fue irreversible. Adicionalmente la autofagia observada en el cardiomiocito es regulada por la vía de las fosfatidilinositol –3-kinasas (Toro B, 2005).

Recientemente un modelo transgénico de cardiomiopatía relacionada a desmina, ha encontrado que en el corazón se forman agresomas, ricos en proteínas poliubiquitinadas. Además se forman oligómeros tipo amiloide, de naturaleza tóxica para la célula, similares a los de la enfermedad de Alzheimer y demuestran que estos oligómeros están presentes en biopsias de pacientes con cardiomiopatías dilatada e hipertrófica (Sanbe et al., 2004).

La revisión de la literatura en esta área nos ha permitido identificar que falta aún por investigar en el cardiomiocito si **diversas condiciones de estrés celular**:

- ¿Modifican los niveles de proteínas poliubiquitinadas?
- ¿Alteran el sistema enzimático de conjugación de ubiquitina y actividad del proteosoma?
- ¿Favorecen la aparición de agregados de proteínas poliubiquitinadas y agresomas en el cardiomiocito?
- ¿Hay alguna relación entre el sistema ubiquitina-proteosoma, agregados de proteínas poliubiquitinadas (eventualmente agresomas) y la autofagia en el cardiomiocito?

A fin de dilucidar algunas de estas interrogantes se plantea la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

“Condiciones de estrés celular como la privación de glucosa, el estrés hiperosmótico por sorbitol, la privación de aminoácidos y la privación de suero, favorecen la aparición de agresomas en el cardiomiocito.”

3. OBJETIVO GENERAL

“Estudiar el efecto *in vitro* de diferentes condiciones de estrés celular, como la privación de glucosa, estrés hiperosmótico por sorbitol, privación de aminoácidos y privación de suero, sobre el sistema ubiquitina – proteosoma”.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Investigar si diferentes tipos de estrés celular (privación de glucosa, estrés hiperosmótico por sorbitol, privación de aminoácidos y privación de suero) modifican la actividad del proteosoma en el cardiomiocito.
- 2.** Estudiar si las diferentes formas de estrés celular antes estudiadas favorecen la formación de agresomas en el cardiomiocito.
- 3.** Investigar la relación proteosoma-autofagia-agresoma.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): medio Hank's, medio DME, pancreatina, Triton X-100, 5-bromo-2'-desoxiuridina, sorbitol, ATP, lactacistina (L6785), 3-metiladenina, rapamicina, Hoechst 33342, anticuerpos anti- β actina, anti γ -tubulina, anti IgG de conejo conjugado a FITC, anti IgG de conejo conjugado a TRITC, anti-IgG conejo conjugado a HRP, anti-IgG ratón conjugado a HRP. En Biomol Research Laboratories (Philadelphia, USA) se adquirieron los siguientes anticuerpos anti-ubiquitin activating-enzyme E1a/E1B (PW 8395), anti ubiquitin conjugating-enzyme E2 (UG 9520), anti- α 520S proteasoma (PW 8125), péptido sustrato del proteosoma N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcoumarina (P802). En Upstate (Virginia, USA) se adquirió el anticuerpo anti-ubiquitina (07-375). En Santa Cruz Biotechnology (California, USA) se adquirió el anticuerpo anti-TFIIB. En Gibco BRL (Carlsbad, California, USA) se adquirieron: colagenasa tipo II, suero fetal bovino (FBS), suero fetal de ternera (FCS), medio EBSS (Earle's media balanced salt solution) y el medio RPMI 1640. En Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel) medio M199, Western blotting Luminol reagent. En Calbiochem (La Jolla, USA) se obtuvo el MG132. En Chemicon (Temecula, California, USA) se adquirió el anticuerpo contra Hsp70. El anticuerpo contra Rab24 y la Vinblastina fueron generosamente donados por la Dra. María Isabel Colombo (Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). El medio de montaje para fluorescencia Dako se adquirió de Dakocytomation (Dinamarca).

5.2. Material biológico

Se utilizaron ratas neonatas Sprague-Dawley (1-3 días de edad) provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

5.2.1. Obtención del cultivo primario de cardiomiocitos neonatos

Para el aislamiento y cultivo de cardiomiocitos neonatos de rata se sacrificaron animales de 1 a 3 días de edad y se procedió de acuerdo a lo descrito por [Bogoyevitch et al., 1995](#). Brevemente, los corazones se removieron y se lavaron cuidadosamente en medio Hank's estéril (Sigma) temperado a 37°C, para luego picarlos finamente e iniciar el proceso de digestión en presencia de 0,2 mg/mL colagenasa tipo II (Gibco, BRL) y 0,6 mg/mL pancreatina (Sigma) en el mismo medio de cultivo. Los cardiomiocitos recolectados de al menos 4 ciclos de digestión se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min a tº ambiente y se resuspendieron en medio base DME/M199 (4:1) (Sigma), conteniendo FBS (Gibco, BRL) al 10%, y se incubaron durante 2h para eliminar los fibroblastos y otros tipos celulares por adhesión diferencial al plástico y obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos. Al cabo de ese tiempo, el sobrenadante se centrifugó a 1000 rpm por 5 min y la pella se resuspendió en DME/M199 (4:1) suplementado con FBS al 5% y FCS al 10%. A partir de esta preparación se tomaron alícuotas para determinar la concentración y la viabilidad de los cardiomiocitos a través de la tinción de Azul de Tripán (Sigma). Para inhibir la proliferación de cualquier tipo celular, el medio se suplementó con 100 µM de 5-bromo-2-desoxiuridina (Sigma). Todos los cultivos se mantuvieron en un incubador termorregulado a 37° C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ y 95% aire. Dependiendo del experimento, se sembraron entre 0,2 - 7 x 10⁶/células por placa, manteniendo los cultivos en placas que fueron previamente recubiertas con gelatina al 2% (p/v).

5.2.2. Cultivo de células HEK293

Células embrionarias de riñón humano (HEK293) fueron mantenidas en DME + 10 % FBS en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ y 95% aire e incubadas a 37° C hasta alcanzar un 80% de confluencia donde fueron procesadas.

5.3. Condiciones de estrés utilizadas

Los cardiomiocitos se mantuvieron al menos 24h en medio con suero, antes de iniciar cualquier procedimiento experimental. Una vez concluido este período, los cardiomiocitos fueron lavados tres veces con medio PBS-Mosconas entibiado a 37° C. A continuación, el cultivo de cardiomiocitos fue tratado con los siguientes medios de cultivo: RPMI 1640 o medio sin glucosa; Sorbitol 300 mM, disuelto en

DME/M199 (4:1) + 10% FBS + 5% FCS; EBSS o medio sin aminoácidos, suplementado con glucosa hasta 4,5 g/L; Medio de mantención DME/M199 (4:1). Todos los medios de cultivo utilizados se suplementaron con penicilina G/estreptomicina a razón de 10 U/mL.

5.4. Inhibidores farmacológicos utilizados

Se utilizó Vinblastina 50 μ M para la disrupción de los microtúbulos. Para la inhibición de la autofagia, se utilizó 3-Metiladenina (10 mM), para lo cual las células fueron preincubadas por 3 horas y, a continuación, ésta fue renovada cada 6 horas de tratamiento. Para la inhibición del proteosoma, se utilizaron Lactacistina y MG132 a una concentración de 6 y 10 μ M, respectivamente (Dong et al., 2004; Stangl et al., 2002). Finalmente, para la inhibición de Tor quinasa se utilizó rapamicina 80 nM.

5.5. Inmunofluorescencia Indirecta

Esta técnica se utilizó para investigar el patrón de proteínas poliubiquitinadas, la distribución subcelular del proteosoma en el cardiomiocito, la colocalización de proteínas poliubiquitinadas con Hsp 70, determinar la ubicación intracelular del centro organizador de microtúbulos, investigar la colocalización de proteínas poliubiquitinadas con Rab y la colocalización de proteínas poliubiquitinadas con LC3-GFP. Para ello, cardiomiocitos (5×10^5 células/placa) se sembraron sobre un cubreobjetos de vidrio recubierto con gelatina (2% p/v). Luego del estímulo, las células se lavaron tres veces con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7mM; Na_2PO_4 10,1 mM; KH_2PO_4 1,76 mM; pH 7,4) frío, se fijaron en paraformaldehído al 4% (p/v), preparado el mismo día de procesamiento de las muestras, durante 25 min. A continuación, las células se permeabilizaron con PBS-Triton X-100 al 0,3% por 20 min y bloqueadas por 1 h con BSA al 3% en PBS. Posteriormente, las células se incubaron a 4° C toda la noche en presencia de los anticuerpos: anti-ubiquitina (1:100), anti-Rab24 (1:100), anti- α 520S proteosoma (1:200), anti- γ Tubulina (1:2500), anti-Hsp70 (1:100) diluidos en BSA al 1% en PBS. Al día siguiente, las células se incubaron durante 1h a temperatura ambiente y protegido de la luz con el anticuerpo anti-IgG conjugado a FITC. En los experimentos de doble marcaje, a continuación del marcaje con el anticuerpo anti-IgG conjugado a FITC, se procedió a incubar con el anticuerpo anti-IgG conjugado a TRITC por 1h y protegido de la luz. En el caso del marcaje de núcleos con Hoechst 33342 (5 μ g/mL), las células

fueron incubadas por 15 min a temperatura ambiente, protegidas de la luz, posterior a la fijación.

Finalmente, las células se montaron sobre Dako en portaobjetos y se observaron en un microscopio confocal LSM 5 Pascal Carl Zeiss.

5.6. Preparación de los extractos de proteínas totales

Esta técnica se utilizó para determinar los niveles de las proteínas poliubiquitinadas, los niveles de las enzimas E1, E2, la presencia de la proteína Rab24 y la subunidad $\alpha 5$ del proteosoma. Luego de finalizar el periodo de estimulación, cada placa de cultivo se lavó tres veces con PBS 1X frío y se agregaron 50 μ L de tampón de lisis (SLB): NaCl 75 mM, HEPES 20 mM, $MgCl_2$ 2,5mM, EDTA 0,1mM, glicerol fosfato 20 mM, Na_3VO_4 0,1 mM, PMSF 0,1mM, DTT 0,5 mM, Triton X-100 0,06% (V/V), leupeptina 4 μ g/ μ L y aprotinina 2 μ g/ μ L, pH 7,6 para lisar los cardiomiocitos y obtener las proteínas totales. Una vez homogenizados, los extractos se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min a 4°C para eliminar el debris celular. Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante por el método de Bradford y finalmente cada muestra se trató con tampón desnaturante 4X, agregando para ello 1/3 del volumen del volumen de muestra y calentando por 5 min a 95°C.

5.7. Obtención de fracciones citosólicas y nucleares

Para determinar la distribución subcelular del proteosoma en el cardiomiocitos, las células se sembraron en placas de 100 mm a razón de 7×10^6 células/placa. Luego de ser privadas de glucosa, las células se lavaron tres veces con PBS frío y se lisaron con 100 μ L tampón A (HEPES 20 mM, EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; KCl 10 mM; DTT 1 mM; NaF 5 mM; Na_3VO_4 1 mM; Na_2MoO_4 10 mM, inhibidor de tripsina 50 μ g/mL, leupeptina 1 μ g/mL, aprotinina 0,1 μ g/mL, PMSF 0,5 mM y NP 40 al 0,5%; pH 7,9). El homogenizado se agitó por vórtex y se centrifugó a 13.000 rpm por 1 min a 4°C. El sobrenadante o fracción citosólica fue colectado y la pella se resuspendió en 35 μ L tampón C (HEPES 20 mM, pH 7,9; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; NaCl 400 mM; DTT 1 mM; NaF 5 mM; Na_3VO_4 1 mM; Na_2MoO_4 10 mM; leupeptina 1 μ g/mL; aprotinina 0,1 μ g/mL y PMSF 0,5 mM). El homogenizado se agitó por 50 min a 4°C, se sonicó y posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm por

5 min a 4°C. Finalmente, el sobrenadante o fracción nuclear fue colectado, se determinó la concentración de las proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976) y se denaturó en tampón de carga 4X y los extractos se almacenaron a -20°C.

5.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas de los extractos celulares se separaron por electroforesis en una cámara Miniprotean (BioRad). Para Ub, E1, E2, α 520S y Rab24 se cargaron 15 y 30 μ g proteínas, respectivamente. La electroforesis se realizó inicialmente a 70V, durante la permanencia del frente en el gel concentrador (3%) y, posteriormente, a 100V en el gel de resolución al 12 % en un tampón de electroforesis.

5.9. Electrotransferencia de proteínas

Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,22 μ m (BioRad) en un sistema de transferencia húmeda a 0,45 A por 90 min.

5.10. Western blot (WB)

Las membranas de nitrocelulosa se incubaron 1h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo leche descremada al 5% en PBS-T para Ub, α 520S proteosoma, Rab24, TFIIB y BSA-T al 3% para E1 y E2. Las membranas se lavaron y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo (policlonal Ub, E1, E2, LC3, TFIIB; monoclonal α 520S proteosoma, β -actina). Las diluciones utilizadas fueron: Ub (1:1000), E1 (1: 500), E2 (1:1000), Rab24 (1:500), α 520S proteosoma (1:1000) β -actina (1:1000), TFIIB (1:1000), diluidos en la misma solución de bloqueo. Luego de tres lavados con PBS-T ó TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo o ratón conjugado a peroxidasa (dilución 1:5000) en la solución de bloqueo por 1h a temperatura ambiente. Al término de la incubación las membranas se lavaron exhaustivamente en PBS-T (TBS-T) y se detectó por quimioluminiscencia utilizando Western blotting Luminol reagent (Biological Industries), utilizando película Biomax MR (KODAK). Las intensidades de las bandas resultantes se determinaron densitométricamente (Scanner AGFA,

software UN-SCAN-IT). Para determinar las variaciones de las diferentes proteínas se normalizó cada banda con respecto a la carga total, obtenida por tinción de rojo Ponceau. Para el fraccionamiento subcelular se utilizaron como controles de carga β actina (fracción citosólica) y TFIIIB (fracción nuclear).

5.11. Determinación de la actividad del proteosoma

Se llevó a cabo un ensayo *in vitro*, basado en la hidrólisis de un sustrato fluorogénico. Para ello las células fueron lisadas con Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Las células se rasparon cuantitativamente, incubadas por 5 min, sonicadas con 5 pulsos de un segundo cada uno y centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. La pella se descartó y el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford y la medición de actividad. El ensayo se realizó tomando 10 μ g de proteínas en un volumen total de 200 μ L. Como sustrato de la actividad tipo quimotripsina, se utilizó el péptido fluorogénico N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcoumarina (N-Suc-LLVY-AMC 25 μ M) (Biomol) (excitación 380 nm, emisión 460 nm) de acuerdo a lo presentado por (Dong et al., 2004) y a lo determinado en la sección anexo. El tampón de reacción consistió en Tris-HCl 25 mM y ATP 2 mM a pH 7,5. Después de 40 min incubación (ver anexo) a 37°C, la reacción se detuvo adicionando 300 μ L etanol. Finalmente, se enrasó con agua a 2 mL y se realizó la medición en un fluorímetro Perkin Elmer Lumiscence spectrometer L550 B/29. Todas las mediciones se realizaron en duplicado y se normalizaron por ng proteínas y los resultados se presentan como unidades de fluorescencia / ng de proteína / min.

5.12. Transducción adenoviral del gen LC3-GFP.

Cardiomiocitos se transdujeron con el adenovirus LC3-GFP 24 h previas a la estimulación de las células. Se utilizó una multiplicidad de infección de 300 partículas formadoras de unidades por célula.

5.13. Determinación de los niveles de proteínas poliubiquitinadas en fracciones solubles e insolubles a Triton X-100

Las células fueron lisadas con tampón de lisis SLB (ver Preparación de los

extractos de proteínas totales) obteniéndose una fracción de proteínas soluble a Tritón X-100. La pella obtenida por esta lisis no fue descartada en este caso, y se procedió a solubilizarla con el tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7,2, SDS 0,1%, deoxicolato de Sodio 1%, EDTA 5 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, PMSF 0,1mM, DTT 0,5 mM, leupeptina 4 µg/µL y aprotinina 2 µg/µL) y se le denominó fracción insoluble a Tritón X-100. A continuación, se tomó una alícuota del solubilizado con la que se determinó su concentración de proteínas con el método de Lowry (Peterson, 1977) y se denaturó en tampón de carga 4X y los extractos se almacenaron a -20°C. Finalmente, las muestras analizaron por WB utilizando el anticuerpo antiubiquitina.

5.14. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como promedio ± SEM de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Tukey. Se consideró un resultado con diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Para responder el primer objetivo planteado en esta memoria, es decir, evaluar si diferentes condiciones de estrés pueden modificar la actividad del proteosoma en el cardiomiocito, se llevó a cabo la caracterización del sistema ubiquitina – proteosoma, que a continuación se detalla.

6.1. Determinación de los niveles de las proteínas poliubiquitinadas, enzima activadora de Ubiquitina (E1a/E1b) y enzima conjugadora de Ubiquitina (E2 25 kDa)

La caracterización del sistema ubiquitina-proteosoma se inició determinando si diversas condiciones de estrés celular modifican el nivel de las proteínas poliubiquitinadas. En la [figura 4.1](#) se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación por densitometría de los Western-blot (WB) para las proteínas poliubiquitinadas. La privación de glucosa generó un aumento transitorio de 1.7 veces respecto del control a las 6h de tratamiento ($p < 0.01$ vs C), para luego disminuir alcanzando los niveles del control desde las 12h manteniéndose hasta las 48h que duró este estudio. Por otra parte, el estrés hiperosmótico por Sorbitol y la privación de suero generaron incrementos leves a las 2h de tratamiento que no son estadísticamente significativos. La privación de aminoácidos no presentó variaciones dada la alta variabilidad observada en el resultado. En la [figura 4.2](#) se muestran los WB representativos para el nivel de las proteínas poliubiquitinadas. Es interesante mencionar que cada tratamiento genera un patrón particular de proteínas poliubiquitinadas. Es así que sólo la privación de glucosa produjo una acumulación de proteínas poliubiquitinadas de pesos moleculares por sobre los 180 kDa. El estrés hiperosmótico generó una acumulación de proteínas poliubiquitinadas con pesos moleculares en un rango de 65 a 95 kDa (ver [figura 4.2](#)). La privación de aminoácidos produjo una señal bien definida alrededor de los 75 kDa y la privación de suero alrededor de los 150 kDa.

En la formación de la cadena de poliubiquitina participan una serie de enzimas. Dos de ellas son la enzima activadora de ubiquitina (E1a/E1b) y la enzima conjugadora de ubiquitina (E2 25kDa) ([Glickman and Ciechanover, 2002](#)). La [figura 5.1](#) representa la cuantificación por densitometría de los datos obtenidos por WB

para el nivel de la enzima E1a/E1b. Los resultados muestran que cuando las células son privadas de glucosa, la masa de esta enzima disminuye a las 48h de tratamiento ($p < 0.05$ vs C). Además, en condiciones de privación de aminoácidos esta enzima aumenta al doble con 6h de tratamiento ($p < 0.05$ vs C), para luego disminuir y alcanzar a las 24h la mitad del valor control ($p < 0.05$ vs C). En cambio, cuando las células son sometidas a estrés hiperosmótico o privadas de suero no se observan variaciones en el nivel de la enzima. En la [figura 5.2](#) se presentan los WB representativos para la masa de la enzima E1a/E1b.

Además, se determinó el nivel de la enzima E2 (25 kDa) mediante WB. Las enzimas conjugadoras de ubiquitina son consideradas limitantes del proceso de ubiquitinación ([Rajapurohitam et al., 2002](#)). E2 está emparentada con la familia UBC4/5 de levaduras, pertenecientes a las enzimas conjugadoras de ubiquitina de la clase I, las que incrementan sus niveles en respuesta a estrés ([Jensen et al., 1995](#)). En la [figura 6.1](#) se presenta la cuantificación de los niveles de esta enzima obtenida de los WB ([figura 6.2](#)). Los resultados muestran que los niveles de esta enzima aumentan transitoriamente 3 veces respecto del control a las 6h de tratamiento ($p < 0.05$ vs C), efecto que disminuye a las 12h. En cambio, en condiciones de privación de glucosa y privación de suero se observa sólo una tendencia al aumento pero sin significancia estadística por su variabilidad. Cuando las células son sometidas a estrés hiperosmótico no se observa mayor variación en los niveles de esta enzima.

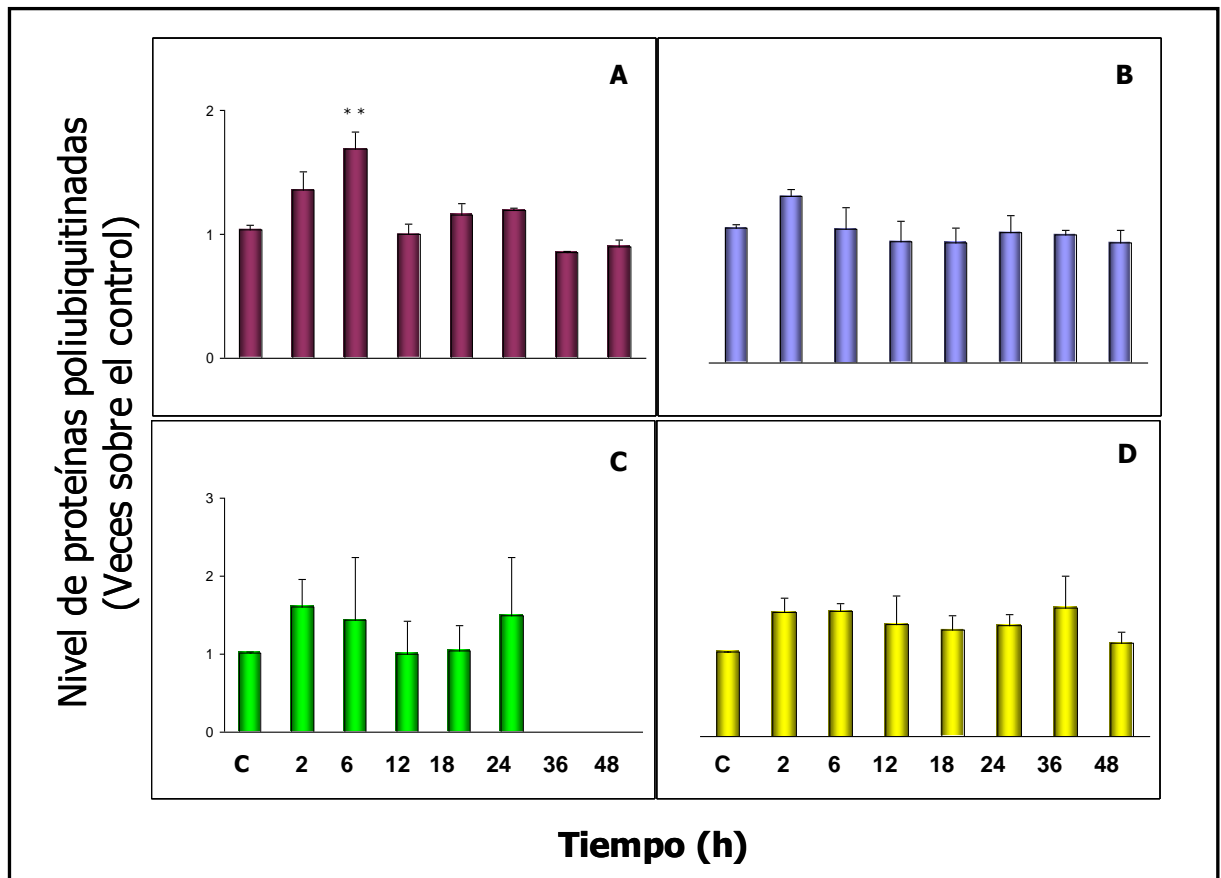


Figura 4.1: Cuantificación por densitometría de proteínas poliubiquitinadas. Las células fueron privadas de glucosa (A), sometidas a estrés hiperosmótico por Sorbitol 300 mM (B), privadas de aminoácidos (C) o privadas de suero (D) en los tiempos que se indican. Se obtuvieron extractos de proteínas totales que fueron resueltos mediante SDS-PAGE 12 % y posteriormente sujetas a WB contra ubiquitina y las bandas fueron cuantificadas una a una utilizando el programa UN-SCAN-IT. Los datos son presentados como el **Promedio \pm SEM de al menos 3** experimentos independientes. ** $p < 0.01$ vs. Control (c) (ANOVA).

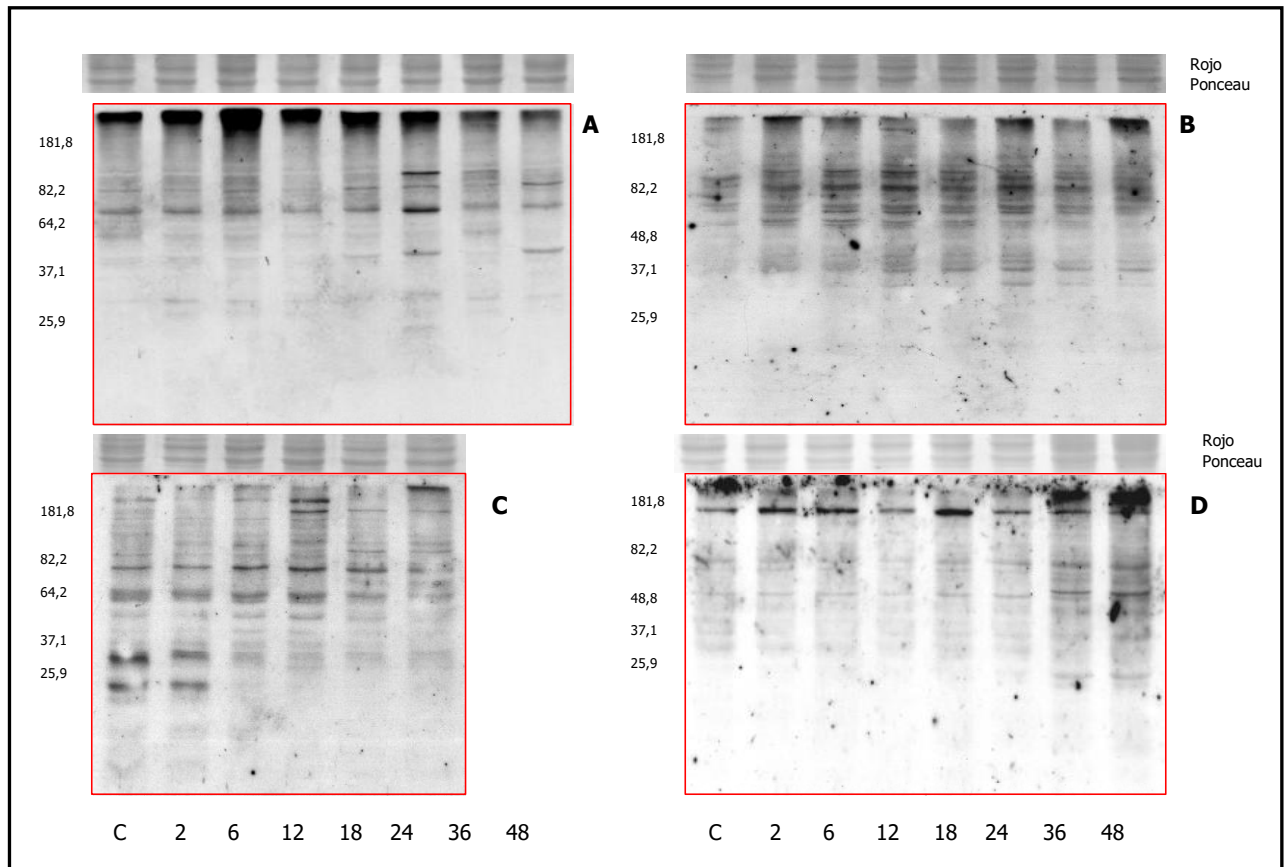


Figura 4.2: WB representativos del nivel de las proteínas poliubiquitinadas. Las células fueron privadas de glucosa (A), sometidas a estrés hiperosmótico por Sorbitol 300mM (B), privadas de aminoácidos (C) o privadas de suero (D) en los tiempos que se indican. Se obtuvieron extractos de proteínas totales que fueron resueltos mediante SDS-PAGE 12% y posteriormente sujetas a WB contra ubiquitina.

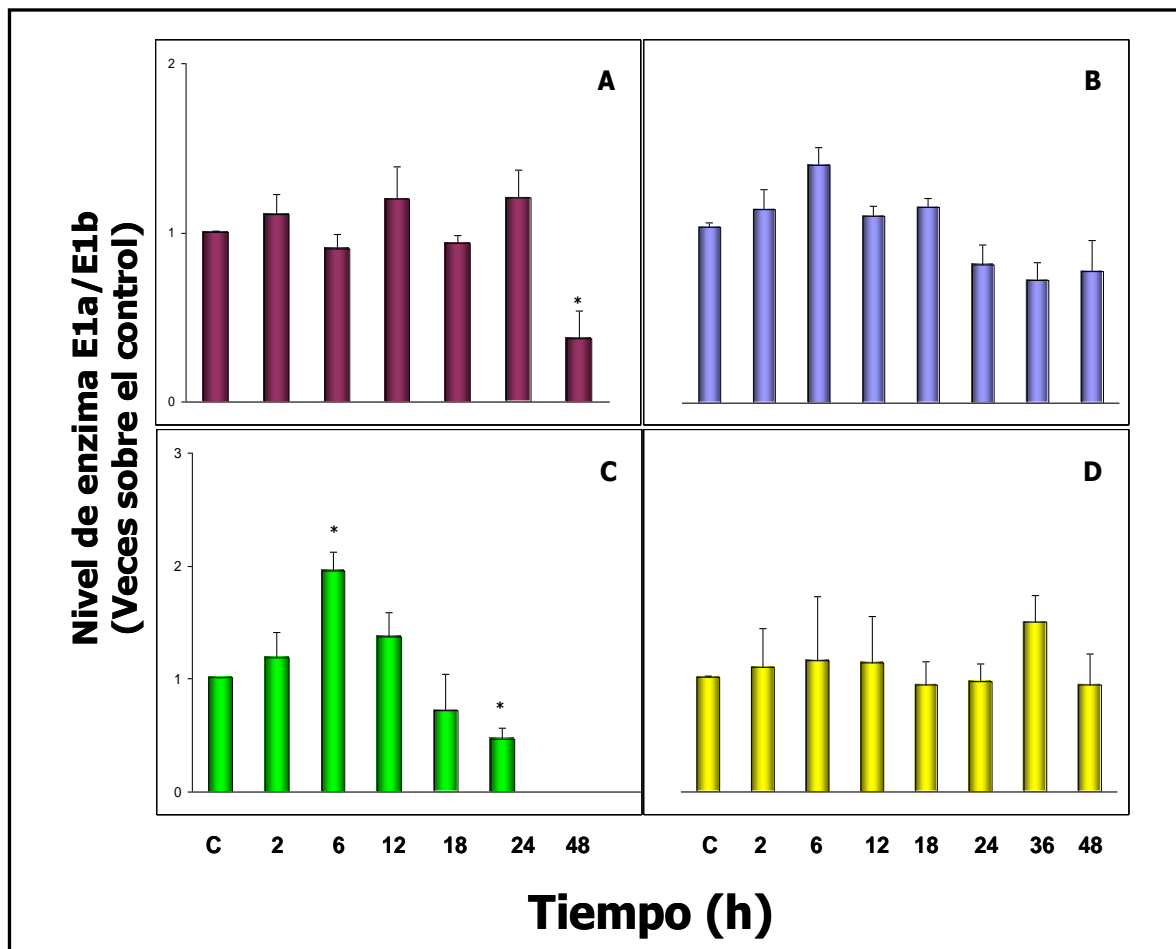


Figura 5.1: Cuantificación por densitometría de los niveles de la enzima activadora de ubiquitina E1a/E1b. Las células fueron privadas de glucosa (A), sometidas a estrés hiperosmótico por Sorbitol 300mM (B), privadas de aminoácidos (C) o privadas de suero (D) en los tiempos que se indican. Se obtuvieron extractos de proteínas totales que fueron resueltos mediante SDS-PAGE 12 % y posteriormente sujetas a WB contra E1a/E1b. Los resultados son presentados como el **Promedio ± SEM de al menos 3** experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control (c) (ANOVA).

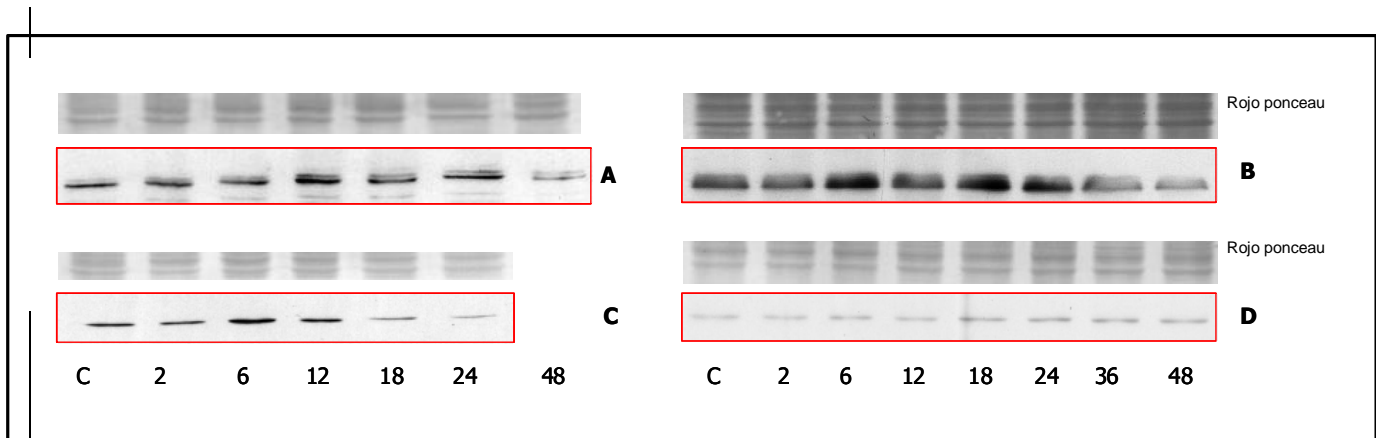


Figura 5.2: WB representativos del nivel de la enzima activadora de ubiquitina E1a/E1b. Las células fueron privadas de glucosa (A), sometidas a estrés hiperosmótico por Sorbitol 300 mM (B), privadas de aminoácidos (C) o privadas de suero (D) en los tiempos que se indican. Se obtuvieron extractos de proteínas totales que fueron resueltos mediante SDS-PAGE 12 % y posteriormente sujetas a WB contra E1a/E1b.

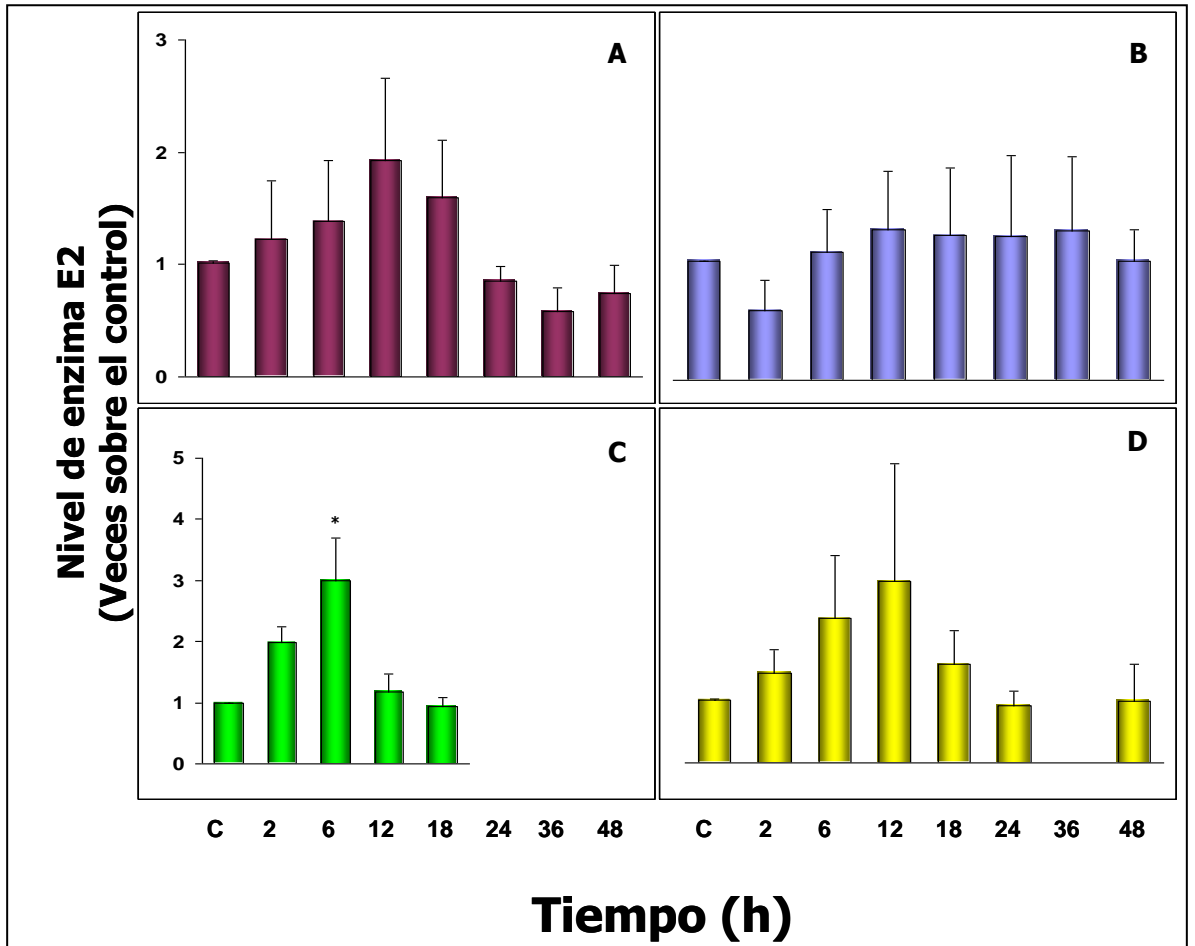


Figura 6.1: Cuantificación por densitometría de los niveles de la enzima conjugadora de ubiquitina E2 (25 kDa). Las células fueron privadas de glucosa (A), sometidas a estrés hiperosmótico por Sorbitol 300mM (B), privadas de aminoácidos (C) o privadas de suero (D) en los tiempos que se indican. Se obtuvieron extractos de proteínas totales que fueron resueltos mediante SDS-PAGE 12 % y posteriormente sujetas a WB contra E2. Los resultados son presentados como el **Promedio ± SEM de al menos 4** experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs. Control (c) (ANOVA).

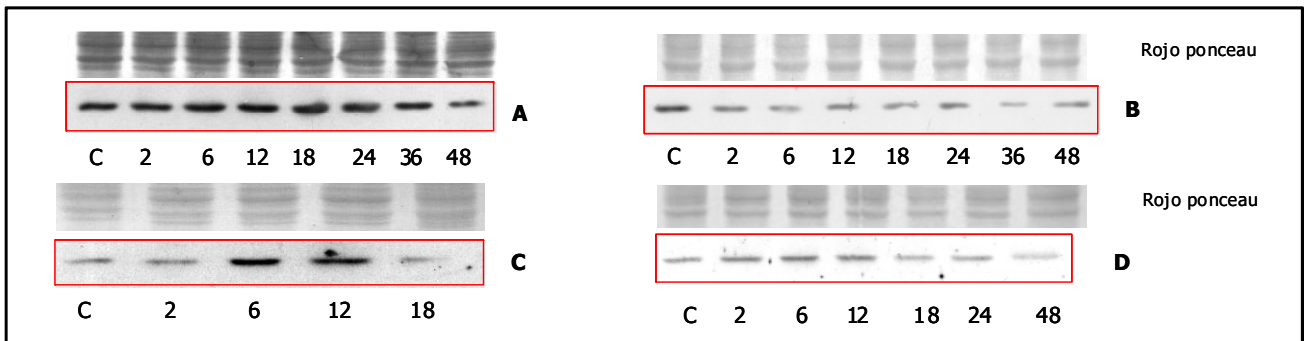


Figura 6.2: WB representativos del nivel de la enzima conjugadora de ubiquitina E2 (25 kDa). Las células fueron privadas de glucosa (A), sometidas a estrés hiperosmótico por Sorbitol 300 mM (B), privadas de aminoácidos (C) o privadas de suero (D) en los tiempos que se indican. Se obtuvieron extractos de proteínas totales que fueron resueltos mediante SDS-PAGE 12 % y posteriormente sujetas a WB contra E2.

6.2. Visualización de proteínas poliubiquitinadas mediante microscopía confocal

Dado que los resultados preliminares obtenidos por WB mostraron que cada condición de estrés aplicada a los cardiomiocitos produce un patrón en particular de proteínas poliubiquitinadas, resultó interesante observar la distribución subcelular de estas proteínas en células fijadas. En la [figura 7](#) se observa que todos los tratamientos generan a las 6h pequeños centros de inmunoreactividad (microagregados) contra proteínas poliubiquitinadas dispersos ampliamente por el citoplasma de la célula y que a las 18h éstos tienden a crecer y concentrarse, formando un agregado, de gran tamaño, en un polo en particular de la zona perinuclear (flechas), excepto en condiciones de privación de suero donde se mantienen los centros pequeños dispersos por el citoplasma celular. Cabe la posibilidad de que estos cuerpos de inclusión sean agresomas ([Kopito, 2000](#)).

6.3. Distribución subcelular del proteosoma

Reportes previos acerca de la distribución subcelular del proteosoma muestran que en el corazón la subunidad $\alpha 520S$ se encuentra en el núcleo del cardiomiocito ([Elsasser et al., 2004](#); [Kostin et al., 2003](#)). Además, otros autores ([Wojcik and DeMartino, 2003](#)) plantean que en el músculo cardiaco el proteosoma se encuentra asociado a regiones específicas de los sarcómeros en el citosol celular. Dados estos antecedentes quisimos corroborar que ocurría en el cardiomiocito de rata neonato. Para ello se utilizaron dos metodologías. En la [figura 8.1](#) se muestra el resultado obtenido mediante WB para la subunidad $\alpha 520S$, en la que se aprecia que esta subunidad se encuentra aproximadamente diez veces más concentrada en la fracción citosólica con respecto a la fracción nuclear. Como segunda metodología y a modo de confirmación de la primera utilizamos la microscopía confocal. En la [figura 8.2](#) se presentan imágenes representativas de los tratamientos aplicados. En estas se destacan que el proteosoma se encuentra predominantemente en el citosol del cardiomiocito, corroborando el hallazgo presentado en la [figura 8.1](#). Cabe destacar que en cardiomiocitos privados de suero, el proteosoma presenta un patrón con tendencia reticulada acentuada (indicado como cabezas de flechas). Sin embargo, cuando éstos son privados de glucosa se logra observar centros de inmunoreactividad tipo cuerpo de inclusión para la subunidad $\alpha 520S$ en zonas perinucleares (ver flechas en [figura 8.2](#)).

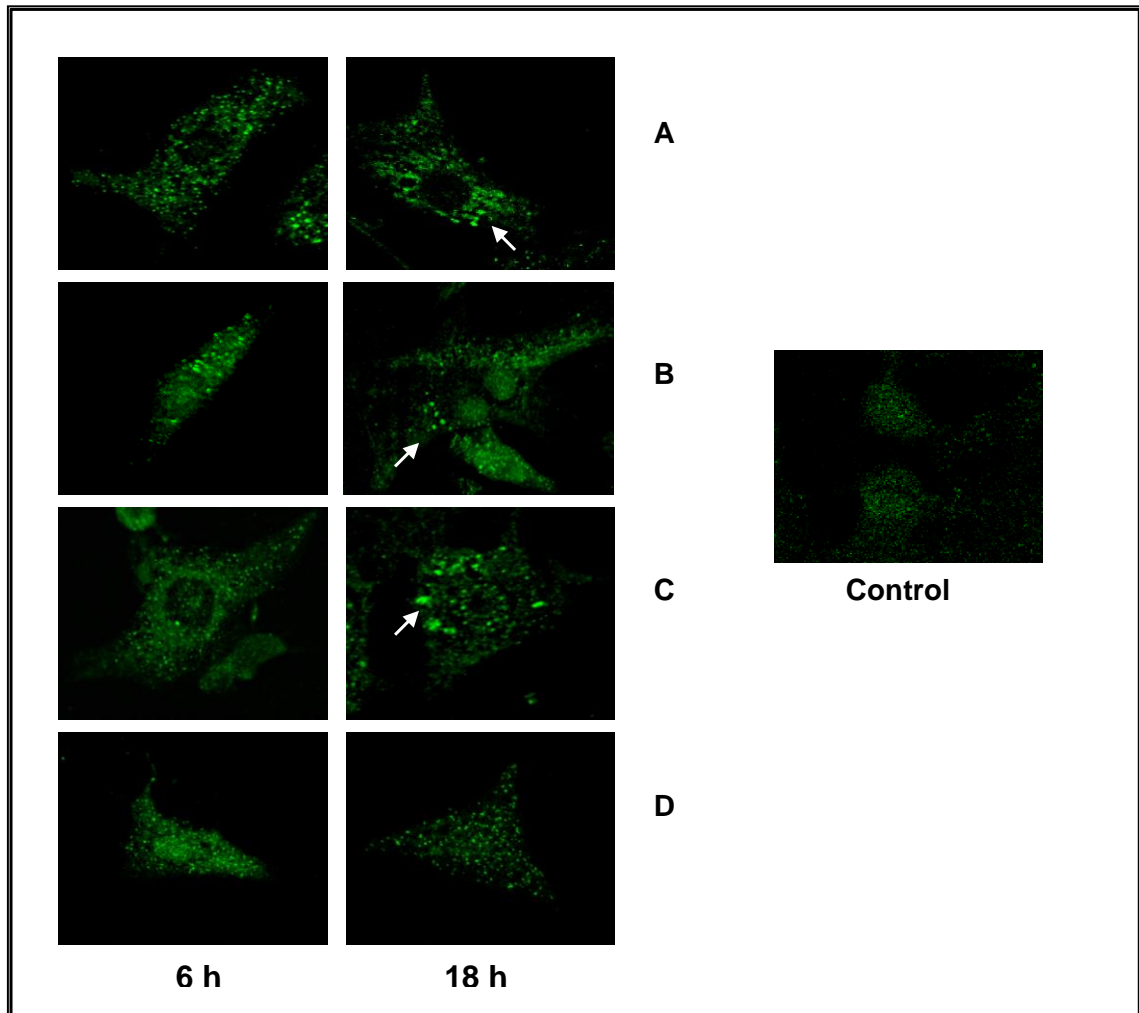


Figura 7: Visualización de proteínas poliubiquitinadas en células fijadas. Cardiomiocitos fueron privados de glucosa (A), sometidos a estrés hiperosmótico por Sorbitol 300 mM (B), privados de aminoácidos (C) o privados de suero (D) por 6 ó 18 horas y se procedió a realizar la inmunodetección de las proteínas poliubiquitinadas mediante inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal. Flechas indican agregado enriquecido en proteínas poliubiquitinadas.

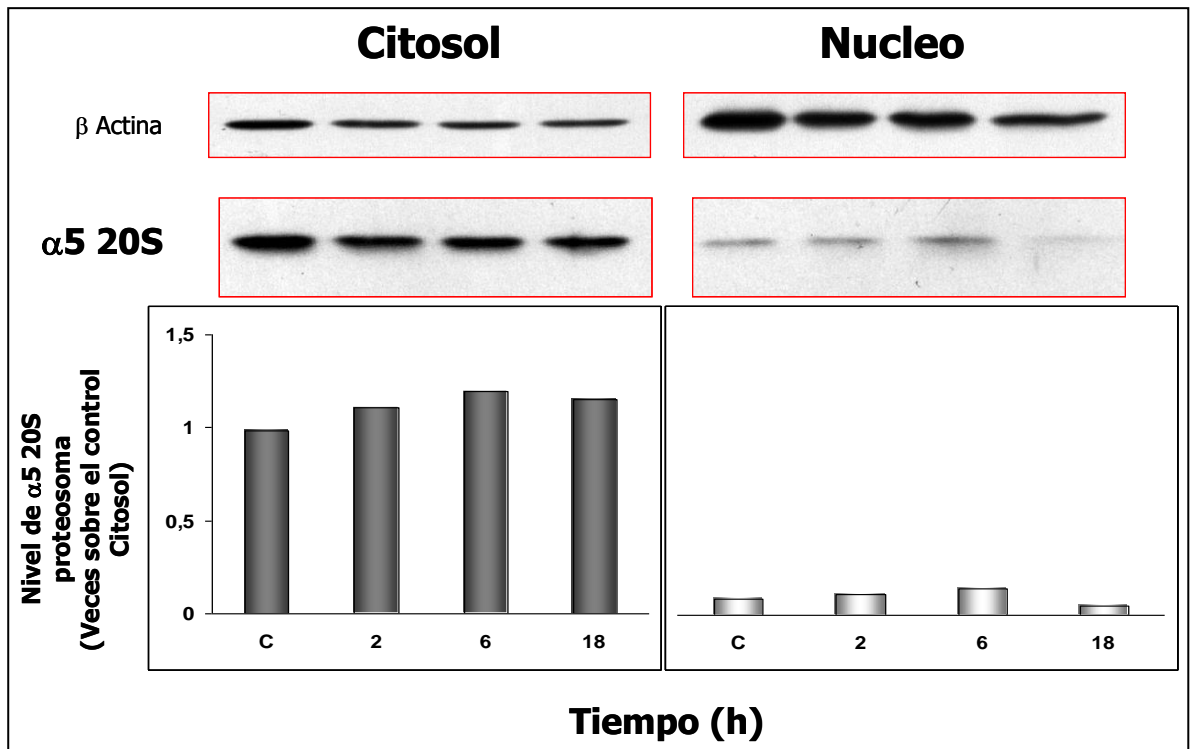


Figura 8.1: Distribución subcelular del proteosoma. Los cardiomiocitos fueron privados de glucosa por distintos tiempos al término del cual se obtuvo las fracciones citosólicas y nucleares. Posteriormente, las proteínas fueron resueltas mediante SDS-PAGE 12% y ensayadas con el anticuerpo anti proteosoma $\alpha 520S$ por WB.

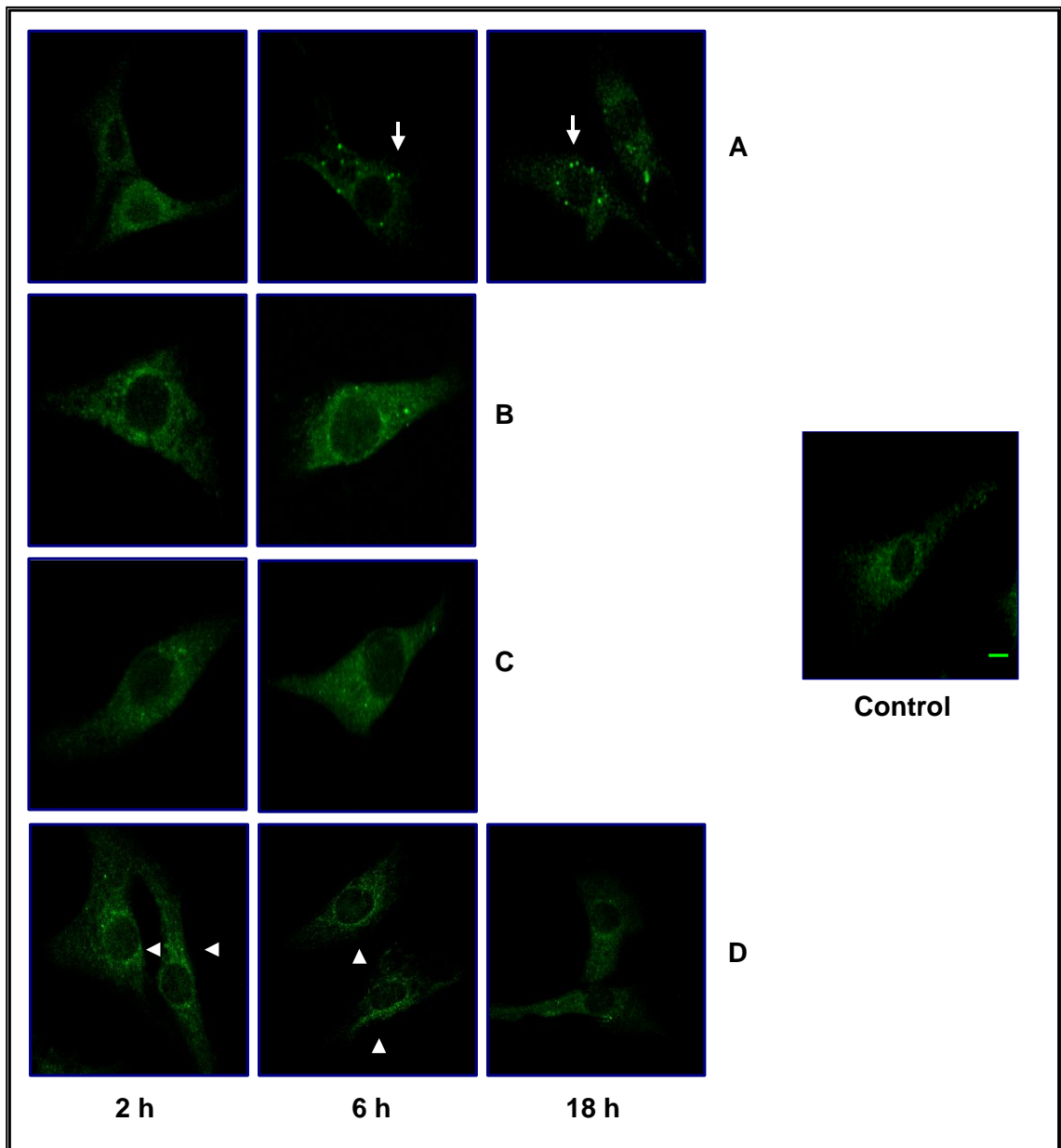


Figura 8.2: Distribución subcelular del proteosoma en células fijadas. Las células fueron privadas de glucosa (A), sometidas a estrés hiperosmótico por Sorbitol 300 mM (B), privadas de aminoácidos (C) o privadas de suero (D) en los tiempos que se indican y se procedió a realizar la inmunodetección de la subunidad $\alpha 520S$ del proteosoma mediante inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal. Con cabezas de flechas se destaca la tendencia reticulada observada y con flechas centros de alta inmunoreactividad para $\alpha 520S$ en zonas perinucleares. Escala 10 μm .

6.4. Determinación de la actividad similar a quimotripsina del proteosoma

El proteosoma presenta tres actividades enzimáticas bien definidas. Éstas son la actividad tipo tripsina, similar a quimotripsina y péptido peptidil glutamil transferasa (Glickman and Ciechanover, 2002). Estas actividades pueden ser medidas específicamente *in vitro* utilizando péptidos fluorogénicos como sustratos. La hidrólisis de estos sustratos por parte del proteosoma es dependiente de ATP y puede ser inhibida específicamente por inhibidores del proteosoma. Además, su uso se encuentra ampliamente avalado (Bulteau et al., 2001; Dong et al., 2004; Liu et al., 2000). En el corazón, la principal actividad proteolítica del proteosoma la constituye la actividad similar a quimotripsina (Liu et al., 2000). Es así que quisimos investigar si los niveles incrementados de proteínas poliubiquitinadas observados en condiciones de privación de glucosa y los agregados ricos en proteínas poliubiquitinadas generados por las condiciones de estrés aplicadas (ver [figura 7](#)) se deban a la inhibición de la actividad similar a quimotripsina. Para ello implementamos un ensayo *in vitro* basado en los antecedentes presentados por Dong et al., 2004. En la sección anexo se detalla como se obtuvieron las condiciones para el desarrollo del ensayo de actividad enzimática. Con estos resultados, sumados a los datos de Dong et al., 2004, decidimos utilizar 25 μ M de péptido sustrato y 40 minutos de incubación a 37°C.

En la [figura 9](#) se representan los resultados obtenidos de los ensayos de determinación de actividad. En ellos se observa que sólo el estrés hiperosmótico por Sorbitol generó un incremento de 1.7 veces de la actividad tipo quimotripsina ($p < 0.05$ vs. C) a las 2h de tratamiento, que fue transitorio en el tiempo. Además se observó una pequeña atenuación en la actividad similar a quimotripsina a las 6h de tratamiento (estrés hiperosmótico y privación de aminoácidos) y a las 18h de tratamiento (privación de glucosa, estrés hiperosmótico y privación de aminoácidos) con respecto a las 2h de tratamiento.

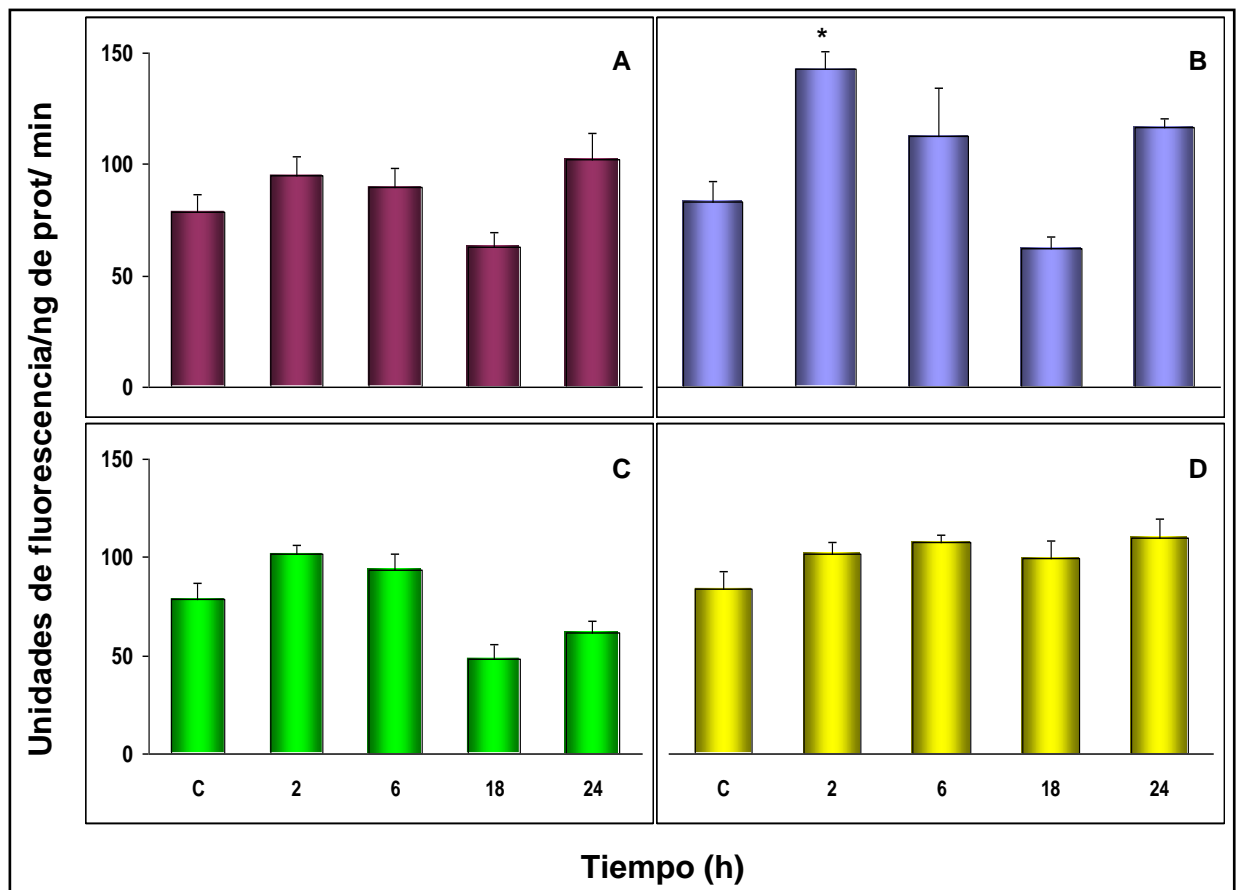


Figura 9: Determinación de la actividad similar a quimotripsina. Cardiomiocitos fueron privados de glucosa (A), sometidos a estrés hiperosmótico por Sorbitol 300 mM (B), privados de aminoácidos (C), o privados de suero (D), en los tiempos que se indican. Luego se extrajeron proteínas solubles y se determinó la actividad tipo quimotripsina del 20S proteosoma. Los datos corresponden al **Promedio ± SEM de n = 3 – 6** experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs C (ANOVA).

Los resultados obtenidos en el primer objetivo nos mostraron que sólo la privación de glucosa generó un incremento en el nivel de las proteínas poliubiquitinadas (ver [figura 4.1](#)), cada tratamiento generó un patrón en particular de las proteínas poliubiquitinadas ([figura 4.2](#)) y que las condiciones de estrés utilizadas produjeron la aparición de cuerpos de inclusión a las 18h de tratamiento (ver [figura 7](#)), por lo que resultó interesante investigar si estos cuerpos de inclusión corresponden a agresomas. Primero, se investigó el rol de un agente disruptor de microtúbulos. En segundo lugar, se investigó dónde se encuentra el centro organizador de microtúbulos en el cardiomiocito y finalmente si los cuerpos de inclusión colocalizan con Hsp70.

6.5. Disrupción de los microtúbulos

Los cuerpos de inclusión se encuentran en un número bajo de copias en el centro organizador de microtúbulos y se forman como un agregado de agregados más pequeños (Kopito, 2000) y cuando su formación depende de microtúbulos, se le denomina agresoma (Johnston et al., 1998). Los resultados de inmunofluorescencia para proteínas poliubiquitinadas mostraron que a las 6h de tratamiento se formaron pequeños agregados de proteínas poliubiquitinadas dispersos ampliamente por el citoplasma de la célula y, que a las 18h, éstos tienden a crecer y concentrarse, formando un agregado en un polo en particular de la zona perinuclear (ver [figura 7](#)), por lo que quisimos conocer el efecto de un agente disruptor de los microtúbulos como Vinblastina. Es así que en la [figura 10](#) se puede observar que al privar de glucosa durante 18h a las células, se observan grandes agregados de proteínas poliubiquitinadas en la zona perinuclear, de preferencia hacia un extremo del núcleo. Al privar de glucosa por 18h más Vinblastina (50 μ M) se observa que no se logran formar estas estructuras, por lo que los agregados de proteínas poliubiquitinadas, presentes en la zona perinuclear, orientados hacia un lado del núcleo celular, corresponden a agresomas.

6.6. Centro organizador de los microtúbulos en el cardiomiocito

Johnston et al. (1998) describieron que el agresoma se forma en el centrosoma (Johnston et al., 1998). Al privar de glucosa a los cardiomiocitos por 18h observamos que se formaron varios agresomas en la zona perinuclear ([figura 10](#)) y no se formó un único agresoma, a diferencia de otros reportes (García-Mata et al.,

1999;Kopito, 2000;Wigley et al., 1999). Para investigar la distribución subcelular del centrosoma en el cardiomiocito y para visualizar este centro se marcó la proteína γ -tubulina que es un marcador de éste (Dictenberg et al., 1998). En la [figura 11](#) se presenta el marcaje del centro organizador de microtúbulos para células HEK 293 y cardiomiocitos. En esta figura se observa que en la línea celular HEK 293 el centrosoma (indicado con flechas) se presenta como un gran centro de inmunoreactividad para γ -tubulina, orientado hacia un lado del núcleo celular. En cambio, en el cardiomiocito, γ -tubulina, y por lo tanto el centro organizador de los microtúbulos, se presentó ampliamente distribuido alrededor del núcleo celular.

6.7. Agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas y Hsp70

Otra característica importante de los agresomas es el reclutamiento de chaperonas tales como Hsp90, Hsp70 y Hsp25 (Garcia-Mata et al., 1999;Kopito, 2000;Sanbe et al., 2004), por lo que quisimos investigar si los agresomas formados en el cardiomiocito colocalizan con Hsp70. En la [figura 12](#) se muestra los resultados de inmunofluorescencia. En estos se aprecia que Hsp70 se presenta muy débil en condiciones basales (control), la cual se ve incrementada cuando las células son mantenidas a 42° C durante 30 min (control positivo). Cuando las células son privadas de glucosa durante 18h se observa una fuerte colocalización de agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas con Hsp70. Similar situación ocurre a las 24h de tratamiento.

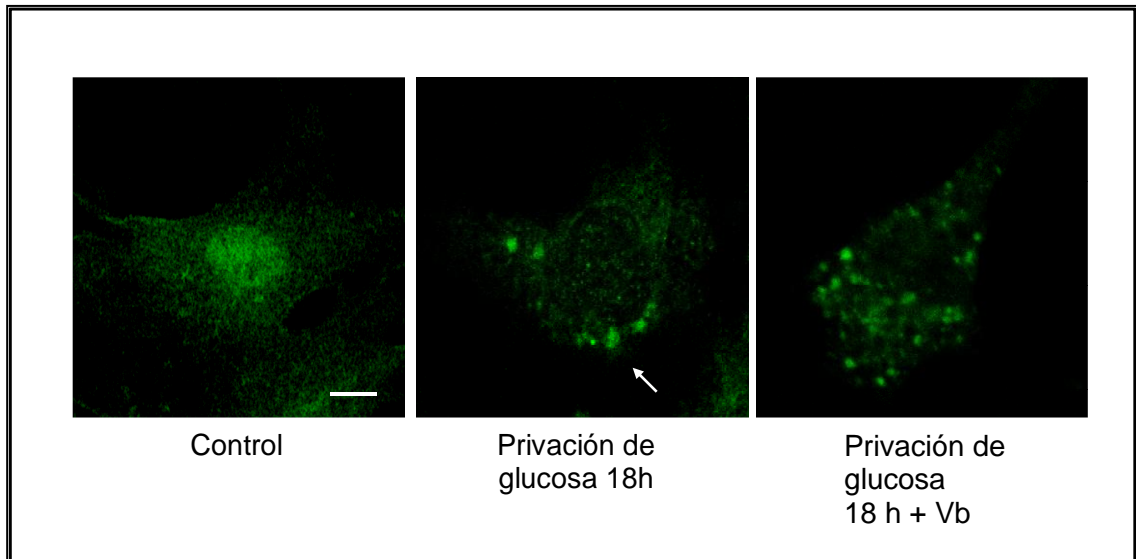


Figura 10: Efecto de la disrupción de los microtúbulos en la formación de agregomas. Las células fueron privadas de glucosa por 18 horas o privadas de glucosa más 50 μ M de Vinblastina (Vb) y se procedió a realizar la inmunodetección de proteínas poliubiquitinadas mediante inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal. Escala 10 μ m.

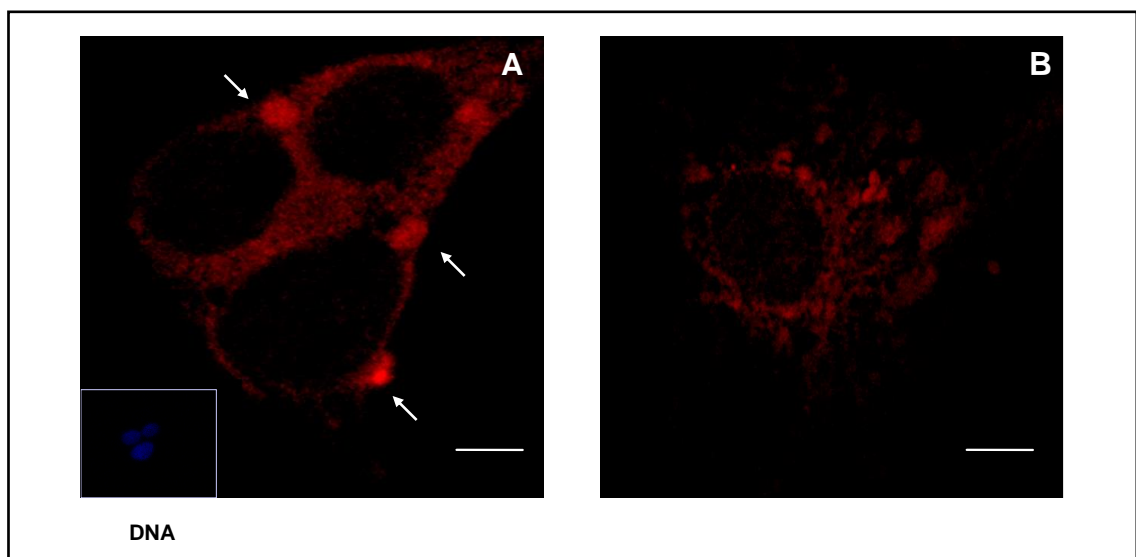


Figura 11: Distribución subcelular del centro organizador de microtúbulos. Células HEK293 (A) y Cardiomiocitos (B) fueron mantenidos por 24h en medio con suero, para luego realizar la inmunodetección de γ -Tubulina y posterior visualización por microscopía confocal. El centrosoma se indica como flechas en la línea celular HEK293 y los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342. Escala 5 μ m.

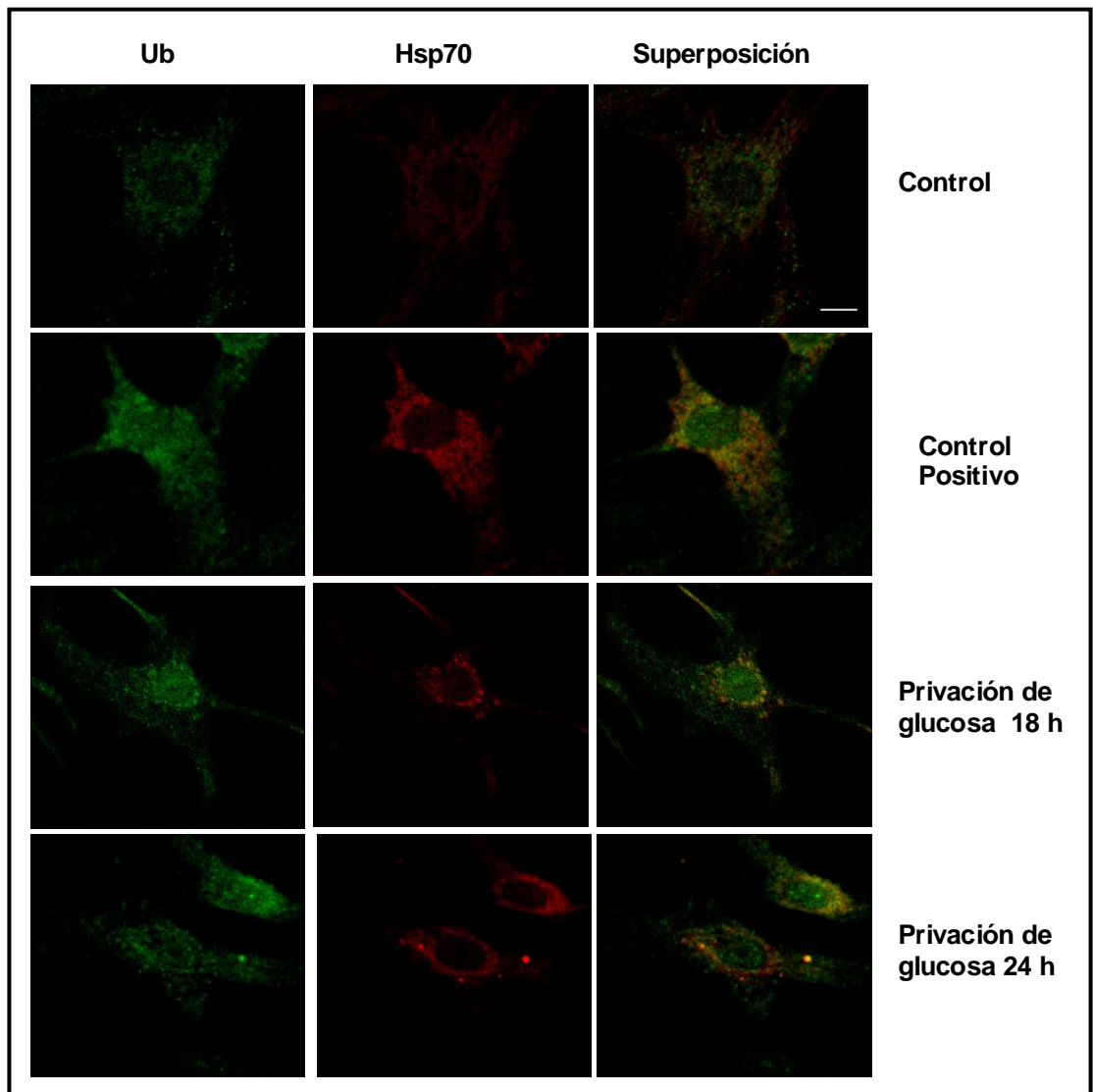


Figura 12: Colocalización de proteínas poliubiquitinadas con Hsp70 en el cardiomiocito. Las células fueron privadas de glucosa en los tiempos que se indican y se procedió a realizar la inmunodetección de las proteínas poliubiquitinadas y de Hsp70 mediante inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal. Escala 10 μm .

6.8. Agresomas y autofagia

6.8.1. Colocalización de agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas con Rab24

Como se mencionó anteriormente, los agresomas y las inclusiones neuronales de ubiquitina (Fortun et al., 2003; Iwata et al., 2005a; Rideout et al., 2004) pueden ser removidos a través de la autofagia. Además, el agresoma produce el reclutamiento de sistemas ATG y la inhibición de HDAC6 bloquea el reclutamiento de LC3 hacia agresomas (Iwata et al., 2005a; Iwata et al., 2005b). Además, frente a la inducción de la autofagia, Rab24 cambia su ubicación subcelular desde la zona perinuclear, donde se presenta difusamente hacia autofagosomas (Munafò and Colombo, 2002) y en nuestro laboratorio se ha demostrado que diferentes condiciones de estrés celular, inducen la autofagia en el cardiomiocito (Toro B, 2005).

Resultó interesante investigar la participación de Rab24 en los agresomas formados por diferentes condiciones de estrés en el cardiomiocito. En la [figura 13](#) se presenta un WB para Rab24, donde se observa que Rab24 se expresa como un duplete, indicando la existencia de dos isoformas de esta proteína. A continuación se estudió si agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas colocalizan con Rab24, mediante inmunofluorescencia indirecta. En la [figura 14](#) se presentan las imágenes obtenidas, mediante microscopía confocal, para células privadas de glucosa, sometidas a estrés hiperosmótico por Sorbitol, privadas de aminoácidos o privadas de suero. En las imágenes se observa que a contar de las 2h tratamiento las proteínas poliubiquitinadas se presentaron como un micropunteado ampliamente disperso a través del citoplasma, observándose agregados proteicos más grandes a las 6h de tratamiento, los que crecen en tamaño a las 18h, disminuyen en número y se concentran en áreas específicas de la zona perinuclear, alcanzando su máximo tamaño a las 24h de tratamiento. Con respecto a Rab24, se observa que a contar de las 2h, ésta se ve que cambia desde un patrón difuso cercano al perinuclear (ver control) hacia estructuras tipo vesiculares, por la acción del estrés hiperosmótico o la privación de aminoácidos, en los cuales Rab24 colocaliza con proteínas poliubiquitinadas. A las 6h de tratamiento se observa que células privadas de glucosa o sometidas a estrés hiperosmótico presentan una fuerte colocalización

de proteínas poliubiquitinadas con Rab24. Al mismo tiempo, en condiciones de privación de aminoácidos se generó una colocalización más débil de proteínas poliubiquitinadas con Rab24, con respecto a las 2h de privación de aminoácidos y más débil con respecto a la privación de glucosa o el estrés hiperosmótico. En células privadas de suero se observa un potente reclutamiento de Rab24 hacia estructuras tipo vesiculares. A las 18 h de tratamiento se observan los mismos cambios que los observados con las proteínas poliubiquitinadas, es decir, hay grandes centros de inmunoreactividad para proteínas poliubiquitinadas y Rab24, donde se observa un alto grado de colocalización entre ambos.

6.8.2. Colocalización de agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas con LC3-GFP

Los resultados anteriores dieron cuenta de la formación de agresomas que presentan una fuerte colocalización con Rab24 ([figura 14](#)), la que se vincula con procesos autofágicos ([Munafo and Colombo, 2002](#)). Como anteriormente se mencionó, la formación del autofagosoma depende de dos sistemas de conjugación esenciales ([Ohsumi, 2001](#); [Schwartz and Hochstrasser, 2003](#)), donde la formación del preautofagosoma depende del sistema Atg12 y la formación del autofagosoma depende del sistema Atg8/LC3 (microtubule – associated protein 1 light chain 3) ([Tanida et al., 2004](#)). LC3 existe como dos isoformas. LC3-I se encuentra libremente en el citosol y con la activación de la autofagia se inicia su proteólisis, transformándose en LC3-II, el cual es conjugado a fosfatidiletanolamina. LC3II permanece unido a las vesículas autofágicas transformándose en el marcador específico de los autofagosomas universalmente aceptado ([Kabeya et al., 2000](#)). Para confirmar el vínculo de los agresomas con la autofagia ([figura 14](#)) decidimos transducir cardiomiocitos con el adenovirus LC3-GFP. Esta estrategia fue seleccionada por sobre marcar LC3 endógeno, ya que el anticuerpo disponible contra esta proteína presenta múltiples bandas observables por WB. En la [figura 15](#) se muestran células transducidas y además marcadas con el anticuerpo antiubiquitina. En ellas se observa que tras 24h de expresión de la proteína LC3-GFP, ésta presenta un patrón difuso y una expresión homogénea en el citosol, al igual que las proteínas poliubiquitinadas. En cambio, cuando los cardiomiocitos son privados de glucosa por 18h, la proteína LC3-GFP se recluta hacia vesículas autofágicas, las que se presentaron principalmente asimétricas. De igual modo, en

situación control las proteínas poliubiquitinadas presentan una distribución uniforme y homogénea en el citosol y los agrosomas ricos en proteínas poliubiquitinadas, inducidos tras 18h de privación de glucosa, presentaron un intenso grado de colocalización con vesículas autofágicas.

6.8.3. Efecto de 3-metiladenina en el nivel de proteínas poliubiquitinadas y en los agrosomas ricos en proteínas poliubiquitinadas.

Antecedentes de nuestro laboratorio revelan que la autofagia es inducida por diferentes condiciones de estrés y es regulada por la vía de las fosfatidilinositol 3 – quinasas (Toro B, 2005). 3-Metiladenina (3-MA) inhibe la formación de vesículas autofágicas, a través de la inhibición de la fosfatidilinositol 3-quinasa de tipo III (Petiot et al., 2002; Seglen and Gordon, 1982). Quisimos evaluar el efecto de la inhibición de la autofagia, utilizando 3-MA a una concentración de 10 mM y para ello las células fueron incubadas en la presencia o ausencia de 3-MA por 3h y posteriormente privadas de glucosa más 3-MA. En la [figura 16](#) se presenta la cuantificación de los niveles de proteínas poliubiquitinadas en fracciones solubles e insolubles a Tritón X-100, de acuerdo a lo presentado en Materiales y Métodos, y se observa que al privar las células de glucosa se produce un incremento transitorio de 1,7 veces en el nivel de proteínas poliubiquitinadas en la fracción soluble a Tritón X-100 ($p < 0.05$ vs C) a las 6h de tratamiento. La inhibición de la autofagia por 3-MA, a las 6h de tratamiento, incrementa en 1,9 veces el nivel de proteínas poliubiquitinadas con respecto al control ($p < 0.01$ vs C). A las 6h de privación de glucosa, en presencia de 3-MA, no generaron cambios significativos en el nivel de proteínas poliubiquitinadas con respecto a células privadas de glucosa. En cambio, la fracción insoluble a Tritón X-100 no se vio afectada por el tratamiento. A continuación, se investigó como se apreciaba este efecto en células fijadas. En la [figura 17](#) se observa que la presencia de 3-MA aparentemente no modifica la formación de los agrosomas, indicando que la inhibición de la autofagia no evita la formación de los agrosomas.

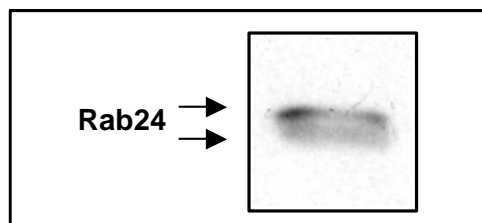
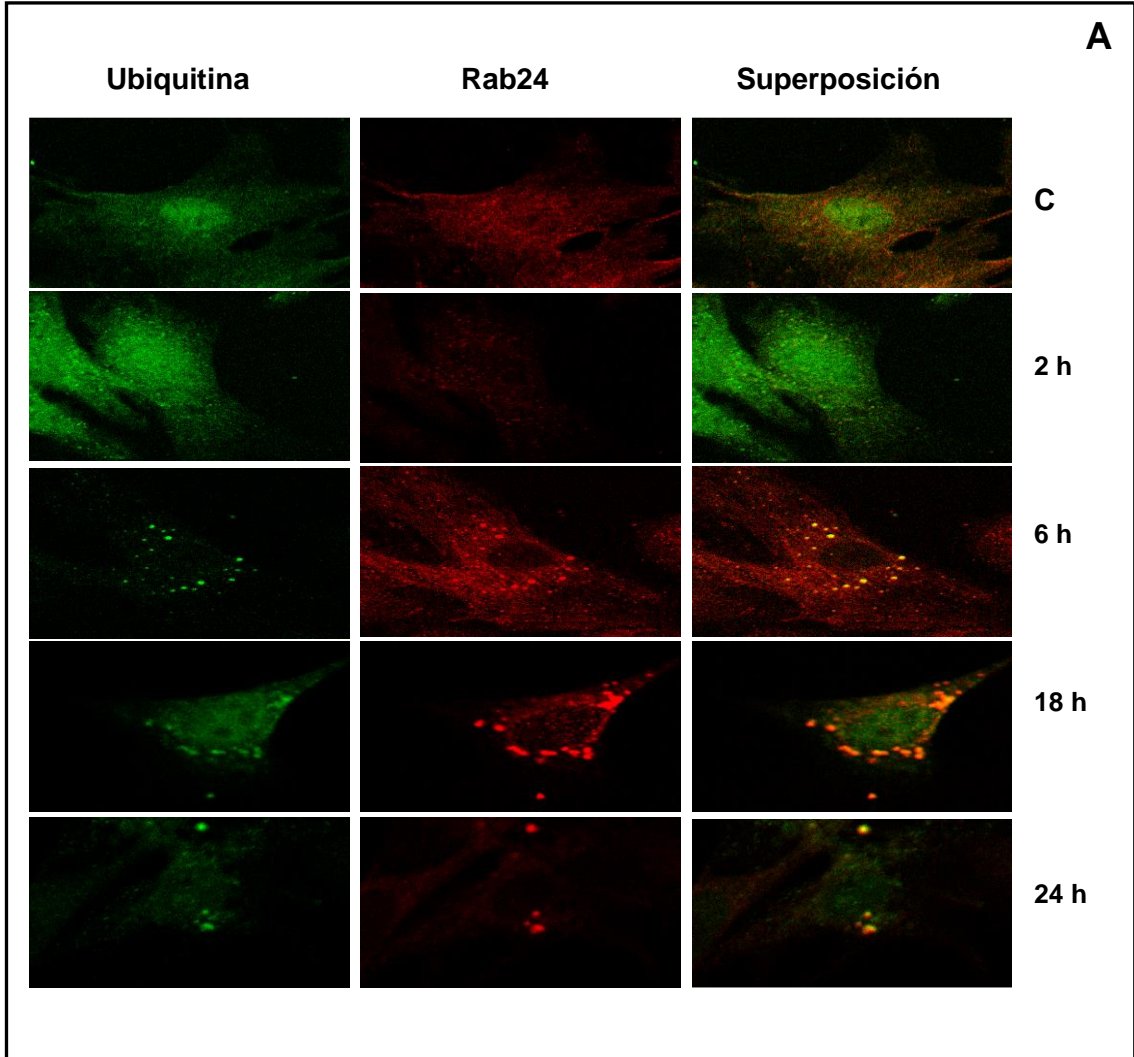
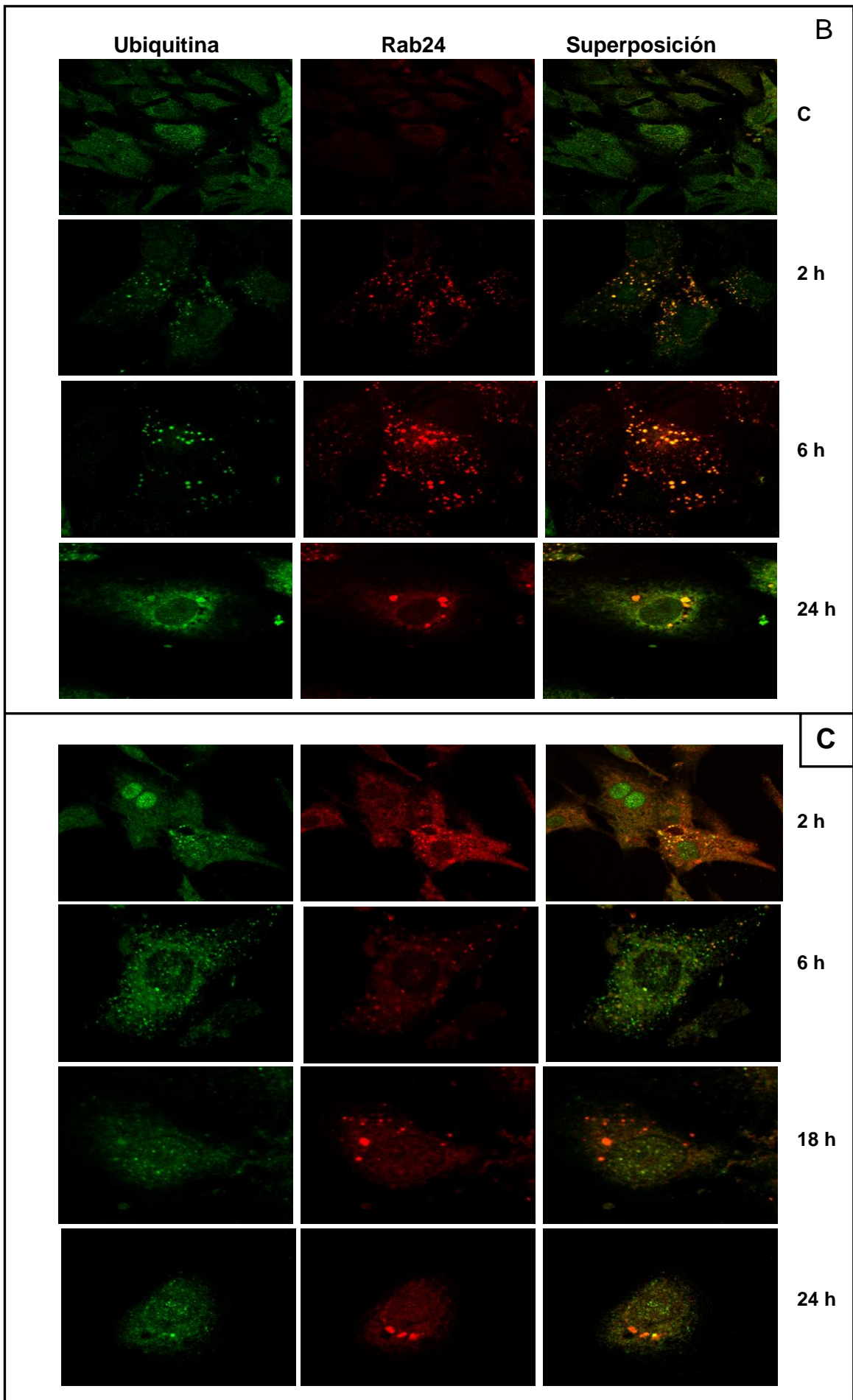


Figura 13: Expresión de Rab24 en cardiomiocitos. Las células fueron mantenidas en DME/M199 (4:1) + 10% FBS + 5% FCS por 24 horas, y se obtuvieron extractos de proteínas totales que fueron resueltos mediante SDS-PAGE al 12 % y posteriormente sujetas a WB contra Rab24.





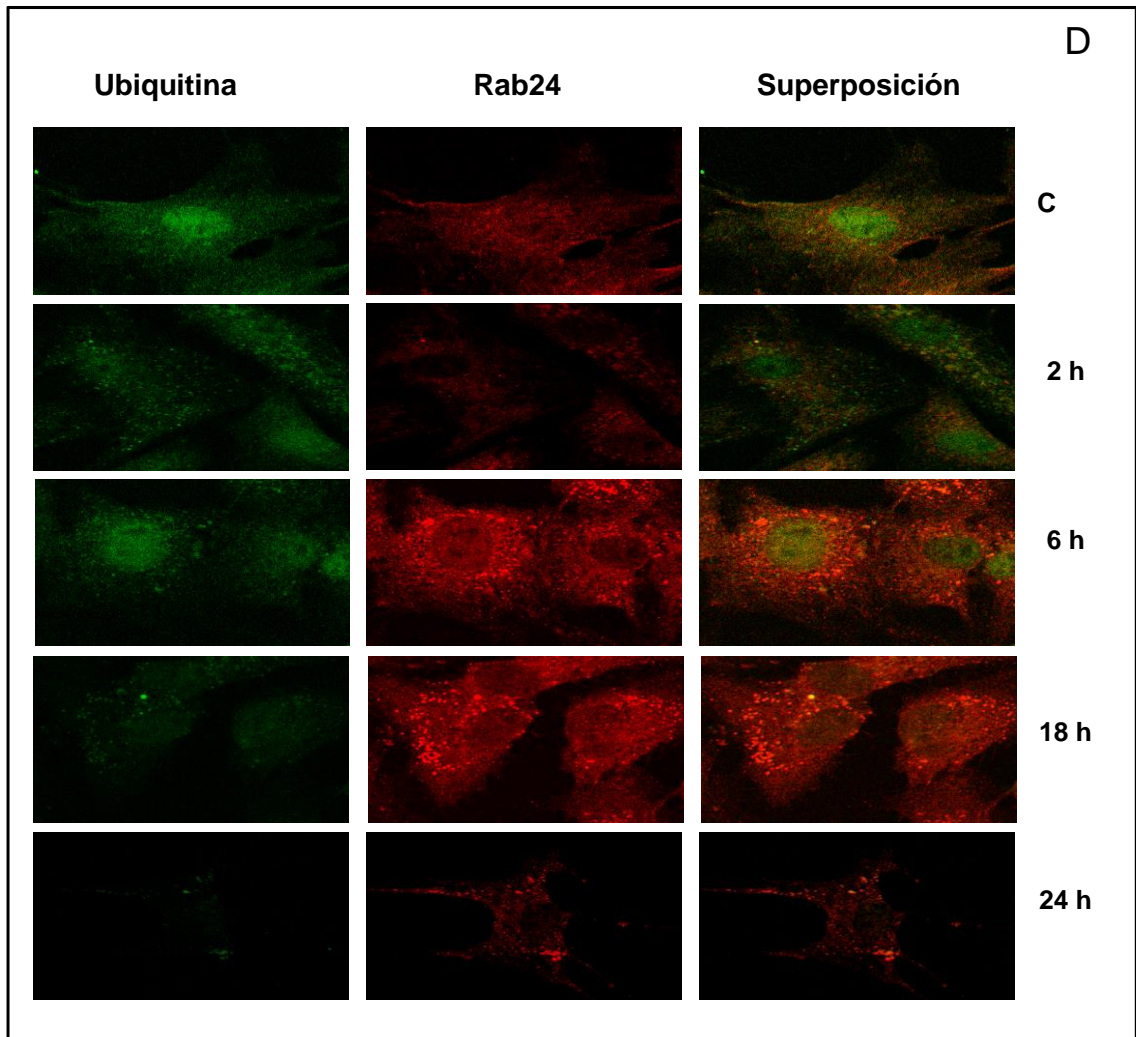


Figura 14: Colocalización de agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas con Rab24. Las células fueron privadas de glucosa (A), sometidas a estrés hiperosmótico por sorbitol (B), privadas de aminoácidos (C) o privadas de suero (D), en los tiempos que se indican, y se procedió a realizar la inmunodetección de las proteínas poliubiquitinadas y de Rab24 mediante inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal.

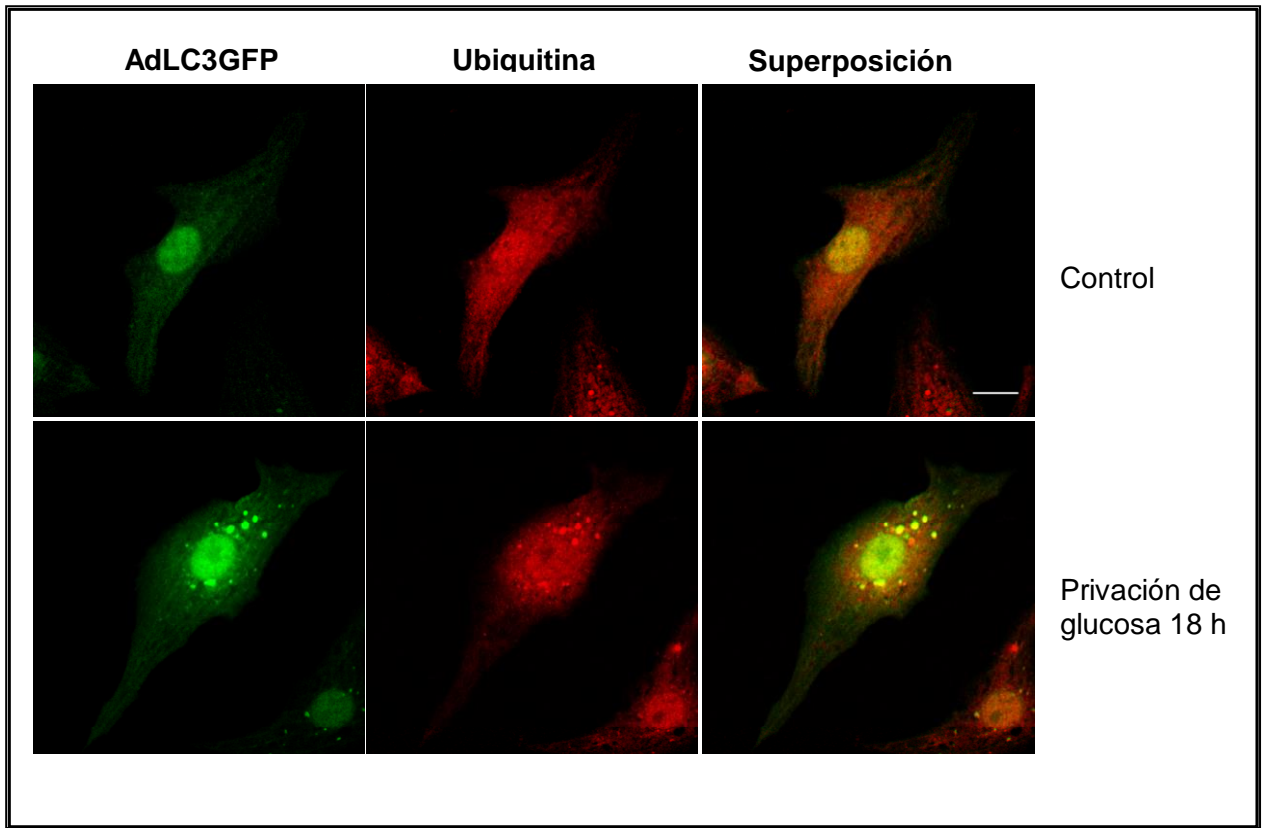


Figura 15: Colocalización de agregomas ricos en proteínas poliubiquitinadas con vesículas autofágicas. Las células fueron mantenidas en DME/M199 (4:1) + 10% FBS + 5% FCS por 24 horas. A continuación fueron infectadas con el adenovirus LC3-GFP durante 24h. Posterior a esto, fueron privadas de glucosa por 18h y se procedió a realizar la inmunodetección de las proteínas poliubiquitinadas mediante inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal. Escala 10 μ m.

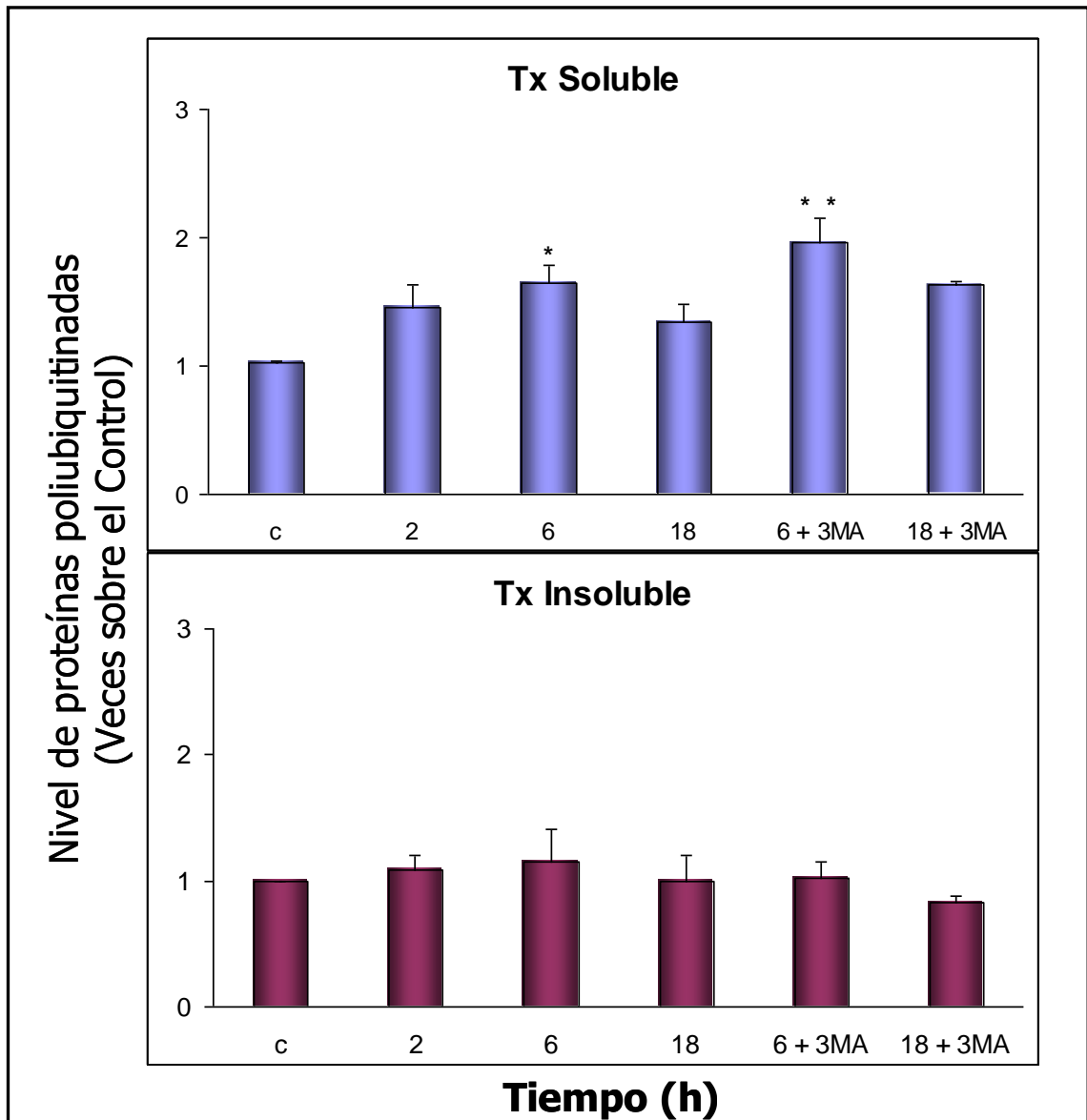


Figura 16: Efecto de 3-metiladenina sobre el nivel de las proteínas poliubiquitinadas en fracciones solubles e insolubles a Tritón X-100. Las células fueron privadas de glucosa o privadas de glucosa más 3-MA (10 mM) en los tiempos que se indican. Las células fueron preincubadas durante 3h con 3-MA y posteriormente, privadas de glucosa más 3-MA, la que fue renovada cada 6 h. A continuación se obtuvieron extractos de proteínas totales (solubles a Tritón X-100) y la pella fue solubilizada con tampón de lisis RIPA (fracción insoluble a Tritón X-100) y las proteínas obtenidas fueron resueltas mediante SDS-PAGE 12 % y posteriormente sujetas a IWB contra proteínas poliubiquitinadas. Los resultados son presentados como **Promedio \pm SEM de n = 3 a 6** experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs C (ANOVA).

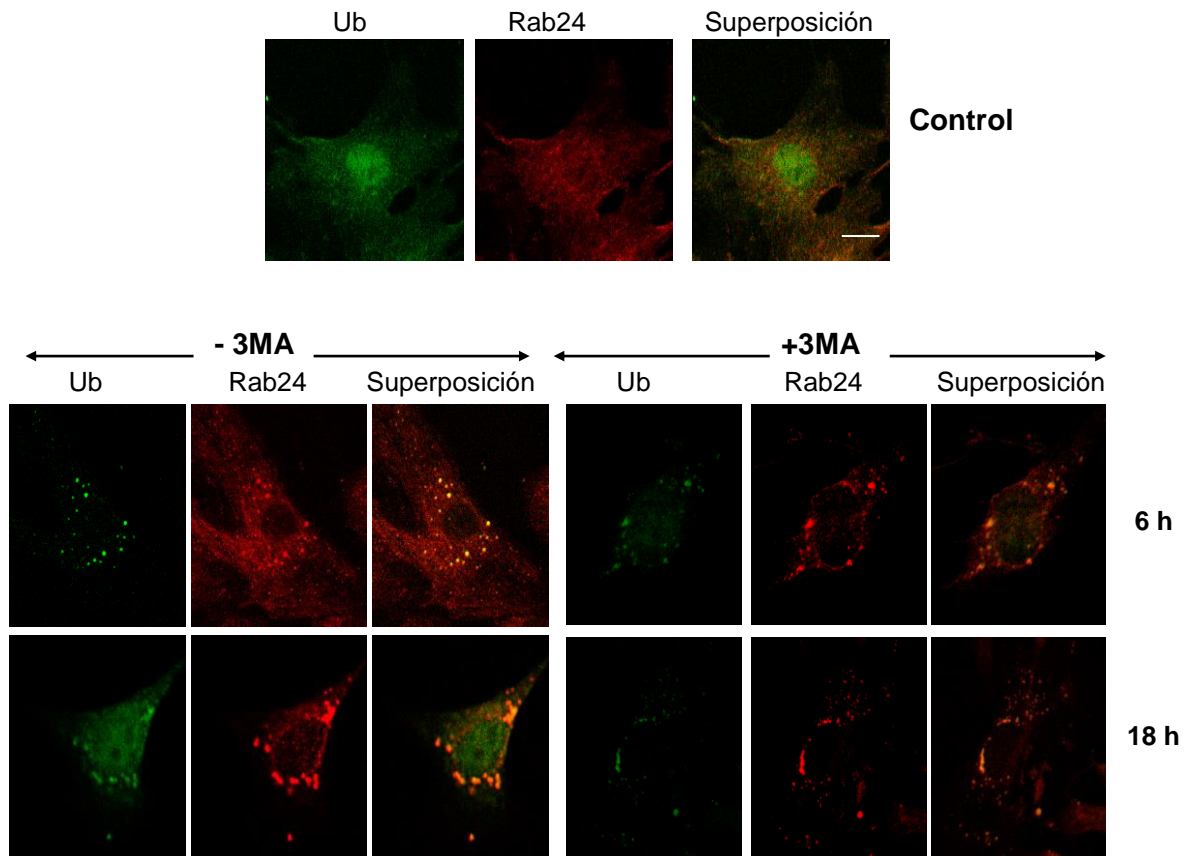


Figura 17: Efecto de 3-metiladenina (10 mM) en la formación de agregomas. Las células fueron privadas de glucosa o privadas de glucosa más 3-MA (10 mM) por 0 (control), 6 ó 18 horas, según se indica y se procedió a realizar la inmunodetección de las proteínas poliubiquitinadas (verde), Rab24 (rojo) mediante inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal. Escala representa 10 μ m.

6.9. Inhibición del proteosoma y agresomas

Una amplia serie de reportes revelan que la inhibición del proteosoma favorece la aparición de agresomas (Harada et al., 2003;lwata et al., 2005a;lwata et al., 2005b;Johnston et al., 1998;Johnston and Madura, 2004;Kopito, 2000;Wigley et al., 1999;Wojcik and DeMartino, 2003). Quisimos determinar que efecto producen inhibidores del proteosoma, como MG132 y Lactacistina, en la formación de agresomas en cardiomiocitos. MG132, o Cbz-Leu-Leu-Leucinal, es el péptido aldehído más utilizado, siendo un potente inhibidor reversible de la actividad similar a quimotripsina, altamente permeable a membranas (Lee and Goldberg, 1998). Lactacistina también es un potente inhibidor de las tres actividades proteolíticas, inhibiendo irreversiblemente a la actividad similar a quimotripsina y tipo tripsina, a diferencia del MG132 (Fenteany and Schreiber, 1998). MG132 a una concentración de 10 μM y Lactacistina 6 μM son capaces de inhibir el proteosoma en cardiomiocitos neonatos (Dong et al., 2004;Stangl et al., 2002).

En la [figura 18](#) se presenta el efecto de MG132 10 μM y en la [figura 19](#) el efecto de Lactacistina 6 μM en la formación de agresomas. En ésta se aprecia que la inhibición del proteosoma induce la aparición de microagregados de proteínas poliubiquitinadas a contar de las 6h de tratamiento, distribuidos en el citoplasma y que a las 18 y 24h alcanzan su máximo tamaño. En cuanto a Rab24, a contar de las 6h de tratamiento, el MG132 produce el reclutamiento de la proteína, observando una fuerte colocalización para Rab24 con proteínas poliubiquitinadas, similar a lo presentado en la [figura 14](#). Cabe destacar el gran tamaño alcanzado por los agresomas a las 18 y 24h en zonas perinucleares. Una situación similar se observa en la [figura 19](#) al tratar las células con Lactacistina 6 μM .

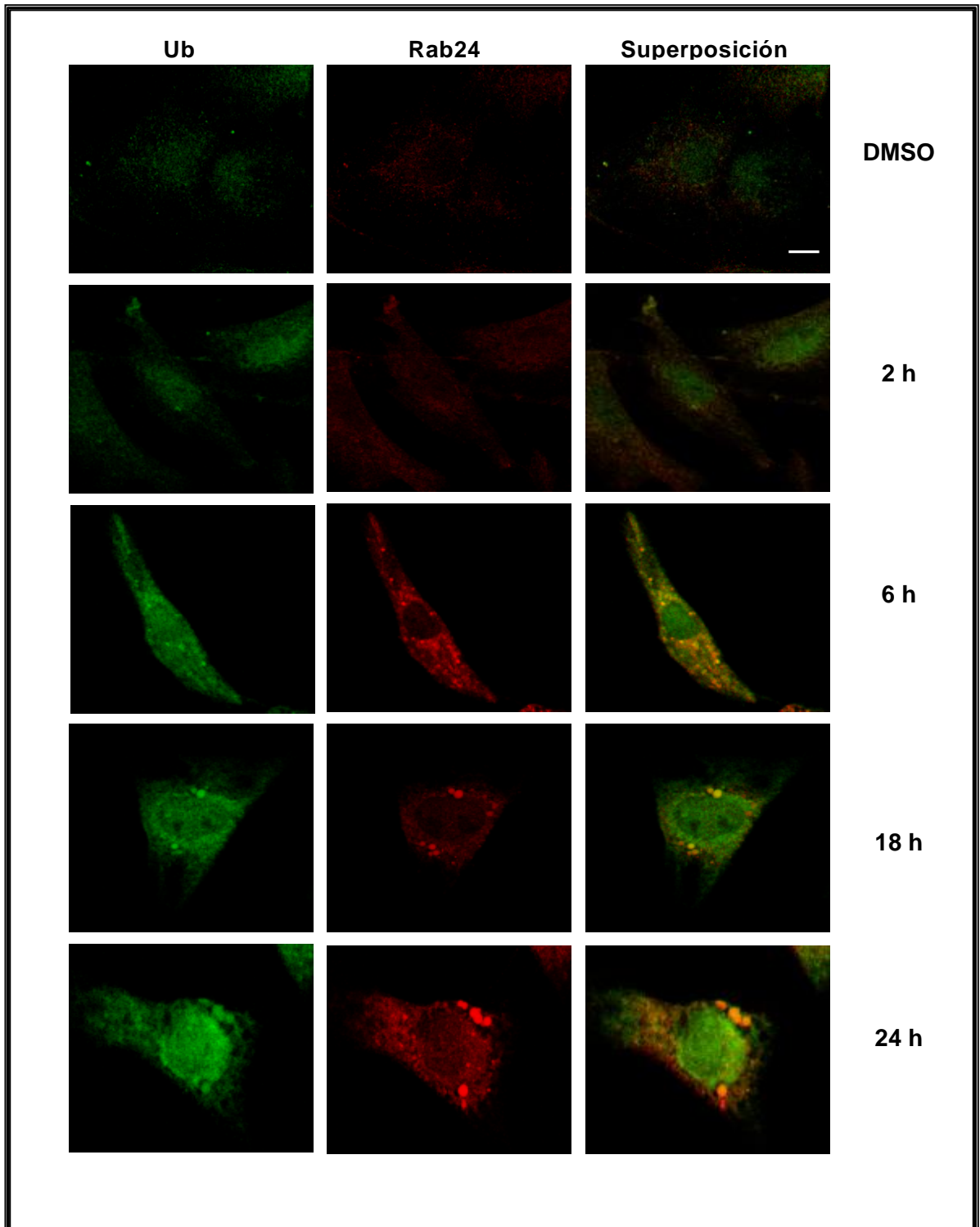


Figura 18: Efecto de la inhibición del proteosoma con MG132 en la formación de agregomas. Las células fueron tratadas con MG132 10 μ M en los tiempos que se indican y se procedió a realizar la inmunodetección de las proteínas poliubiquitinadas y de Rab24 mediante inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal. Escala 10 μ m.

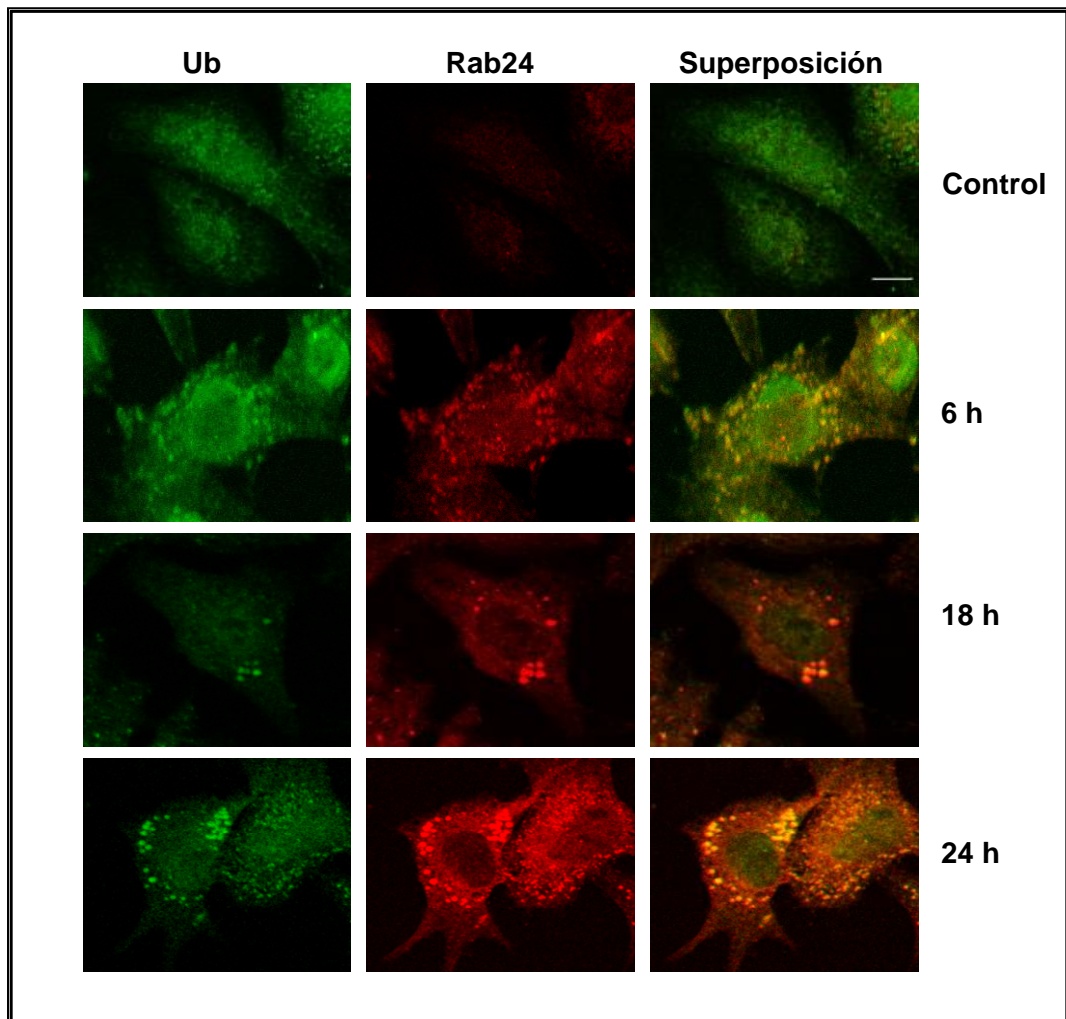


Figura 19: Efecto de la inhibición del proteosoma con Lactacistina en la formación de agregomas. Las células fueron tratadas con Lactacistina 6 μ M en los tiempos que se indican y se procedió a realizar la inmunodetección de las proteínas poliubiquitinadas y de Rab24 mediante inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal. Escala 10 μ m.

6.10. Agresomas, proteosoma y autofagia

En las [figuras 18 y 19](#), observamos que la inhibición del proteosoma induce la formación de agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas, que además colocalizaron fuertemente con Rab24, indicando que inhibidores del proteosoma pueden inducir autofagia. Además, quisimos investigar si la autofagia puede depurar a la célula de los agresomas formados por la inhibición del proteosoma. En la [figura 20](#) se observa que al tratar las células con rapamicina 80 nM por 6h, se produce el reclutamiento de Rab24 hacia estructuras tipo vesículas autofágicas y que la inducción de la autofagia no altera el patrón de las proteínas poliubiquitinadas. En cambio, al tratar con MG132 10 μ M por 6 horas se observa el incremento en la inmunoreactividad hacia proteínas poliubiquitinadas con respecto al vehículo dimetilsulfoxido (DMSO) y se observa el reclutamiento de Rab24 (flechas). Interesantemente, al inhibir al proteosoma con MG132 (10 μ M) o lactacistina (6 μ M) e inducir simultáneamente la autofagia con rapamicina, se produce la depuración de las proteínas poliubiquitinadas, observándose vesículas autofágicas prácticamente libres de proteínas poliubiquitinadas, lo que indica que la autofagia puede remover los agresomas inducidos por la inhibición del proteosoma.

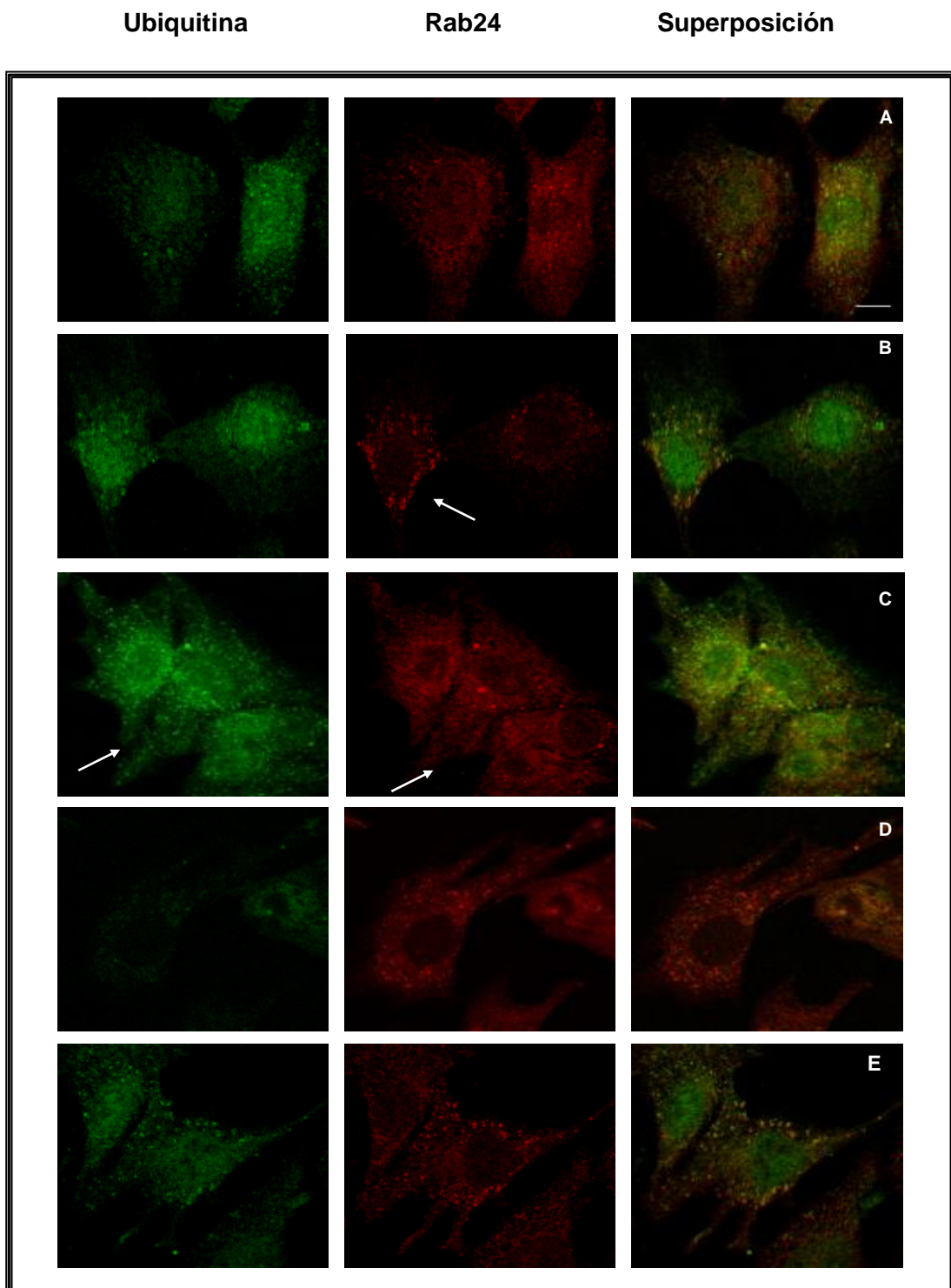


Figura 20: Efecto de la inducción de la autofagia en la depuración de agresomas. Las células fueron tratadas con MG132 10 μ M, Rapamicina 80 nM, MG132 más Rapamicina o Lactacistina más Rapamicina durante 6h y se procedió a realizar la inmunodetección de las proteínas poliubiquitinadas y de Rab24 mediante inmunofluorescencia indirecta y posterior visualización por microscopía confocal. Escala 10 μ m.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se investigó el efecto de distintas condiciones de estrés celular sobre el sistema ubiquitina-proteosoma en el cardiomiocito, para lo cual se seleccionaron tratamientos asociados a condiciones de isquemia como privación de glucosa, estrés hiperosmótico por Sorbitol, privación de aminoácidos y privación de suero. Paralelamente a la ejecución de esta memoria se demostró que estas condiciones inducen autofagia y comprometen la viabilidad del cardiomiocito (Toro B, 2005).

En condiciones de isquemia cerebral transitoria se generan agregados proteicos que contienen proteínas poliubiquitinadas (Hu et al., 2000). También en condiciones de coma hipoglicémico, la ubiquitina libre se depleta y se forman agregados de proteínas poliubiquitinadas en ciertas regiones del cerebro (Ouyang and Hu, 2001). Por otro lado a nivel cardiovascular, biopsias de pacientes con insuficiencia cardiaca han mostrado amplios depósitos de proteínas poliubiquitinadas en células que son positivas para marcadores de autofagia (Kostin et al., 2003). A estas evidencias se suman varios trabajos en corazón humano hibernante (Elsasser et al., 2004), cardiomiopatía diabética e isquémica (Knaapen et al., 2001;Weekes et al., 2003) y en un modelo de cardiomiopatía relacionada con desmina (Sanbe et al., 2004). Es necesario mencionar que hasta esa fecha sólo existían evidencias de disfunción del sistema ubiquitina-proteosoma en enfermedades neurodegenerativas y a partir de estos antecedentes resultó interesante estudiar el efecto de condiciones de estrés celular en las células cardiacas.

7.1. El sistema ubiquitina proteosoma en el cardiomiocito

Tal como se mencionó anteriormente, en la cardiomiopatía diabética e isquémica (Knaapen et al., 2001;Weekes et al., 2003), insuficiencia cardiaca (Kostin et al., 2003) y corazón hibernante (Elsasser et al., 2004), se generan agregados de proteínas poliubiquitinadas. Por ello se investigó si condiciones de estrés asociadas a condiciones de isquemia alteran la actividad del proteosoma, produciendo el incremento de proteínas poliubiquitinadas y que éstas tiendan a formar agregados proteicos. Los resultados mostraron que sólo la privación de glucosa incrementó transitoriamente el nivel de proteínas poliubiquitinadas (Figuras 4.1 A y 4.2 A), el

cual no se debió al incremento del nivel de la enzima conjugadora de ubiquitina E2 – 25 kDa ([figuras 6.1 A y 6.2 B](#)). Estas últimas enzimas son claves y limitantes del proceso de ubiquitinación ([Rajapurohitam et al., 2002](#)), por lo que cabe la posibilidad que el incremento en el nivel de proteínas poliubiquitinadas observadas en células privadas de glucosa se deba a un incremento en el nivel de otro(s) miembros de la familia de enzimas conjugadoras ya reportados como E2 20 kDa ([Kostin et al., 2003](#)), E2 14 kDa y UBC4 ([Rajapurohitam et al., 2002](#)).

Además, la privación de glucosa y el estrés hiperosmótico mediado por Sorbitol, produjeron la acumulación de proteínas poliubiquitinadas por sobre los 180, 65 a 95 kDa, respectivamente ([figura 4.2 A y B](#)), lo que se tradujo en la aparición de cuerpos de inclusión a las 18 h de tratamiento ([figura 7 A y B](#)). Estos hallazgos nos hace suponer que el cuerpo de inclusión se forma ya sea por agregación de proteínas poliubiquitinadas de alta masa molecular en las células son privadas de glucosa o por proteínas de masa molecular intermedia en las células expuestas a estrés hiperosmótico. La privación de aminoácidos también promovió la aparición de cuerpos de inclusión en zonas perinucleares a las 18h de tratamiento ([figura 7 C](#)), aunque no a causa de un incremento en el nivel de proteínas poliubiquitinadas ([figura 4.1 C](#)), o bien, a la acumulación de proteínas poliubiquitinadas de un rango de peso en particular ([figura 4.2 C](#)). La privación de suero ocasionó la formación de pequeños micro-agregados ampliamente dispersos en el citosol, observándose la formación de cuerpos de inclusión de menor tamaño en comparación a los otros tratamientos ([figura 7 D](#)).

Igualmente en estos estudios se investigó la ubicación intracelular del proteosoma en el cardiomiocito de rata y se estableció que se encuentra predominantemente en el citosol ([figuras 8.1 y figura 8.2](#)), a diferencia del corazón humano donde el proteosoma se encuentra en el núcleo del cardiomiocito ([Elsasser et al., 2004;Kostin et al., 2003](#)). En particular llamó la atención que el proteosoma se mostrase reticulado en células privadas de suero ([figura 8.2 D](#)) y en centros de alta inmunoreactividad en zonas cercanas al perinuclear en las células privadas de glucosa ([figura 8.2 A](#)). Esta observación es reforzada por recientes publicaciones que indican que los componentes del sistema ubiquitina–proteosoma se encuentran enriquecidos en cuerpos de inclusión ([Bennett et al., 2005;Kopito, 2000](#)).

Si bien, la privación de glucosa, el estrés hiperosmótico por sorbitol, la privación de aminoácidos y de suero indujeron la aparición de cuerpos de inclusión en zonas perinucleares ([figura 7](#)) que, según nuestras estimaciones, fluctúan entre 1,5 a 3 μm de diámetro, su aparición a las 18h de tratamiento no se debió a inhibición del proteosoma a tiempos más tempranos ([figura 9](#)). Estos hallazgos sugieren que condiciones de estrés provocan que el proteosoma se vea sobrepasado por un “cóctel” de proteínas poliubiquitinadas y éstas forman agregados, los que están impedidos de ingresar al proteosoma por ser unas 1000 veces más grandes que el diámetro del proteosoma 20S ([Wolf and Hilt, 2004](#)), para ser degradados. Estos resultados se ven reforzados por los resultados de [Komatsu et al](#), quienes trabajando con hepatocitos de un ratón deficiente de ATG7 encontró agregados de proteínas poliubiquitinadas sin que el proteosoma se encontrará inhibido ([Komatsu et al., 2005](#)). Que el proteosoma se vea excedido, no excluye la posibilidad que condiciones de estrés alteren la estabilidad del complejo proteosoma 26S, donde condiciones de estrés favorezcan la disociación o impidan el correcto ensamblaje del proteosoma, o bien, alteren la funcionalidad de subunidades activadoras o represoras del proteosoma, lo que tendría como consecuencia que un sustrato proteico no pueda ser reconocido, desplegado y translocado correctamente para ser degradado en el proteosoma 20S, produciéndose el fenómeno de agregación. Experimentos como la caracterización del proteosoma mediante electroforesis de geles en condiciones nativas ([Elsasser et al., 2005](#)) ayudarán a resolver algunas de estas interrogantes planteadas. Adicionalmente sería necesario disponer de una estrategia experimental alternativa de determinación de la actividad del proteosoma, independiente de un sustrato fluorogénico cuya degradación es independiente de procesos como el de ubiquitinación, desplegamiento o reconocimiento y que sólo permite obtener información acerca de la capacidad del sitio catalítico y no de las subunidades reguladoras, activadoras o represoras ([Hernandez et al., 2004](#)). Además, cabe la posibilidad que sea sólo una población limitada de células que presente una alteración en la actividad del proteosoma y que al llevar a cabo el ensayo enzimático en un homogenizado celular, donde se produce el fenómeno de dilución, no será posible identificar esta población celular. Para identificar este tipo de poblaciones, [Dong et al](#) logró determinar la actividad del proteosoma en cardiomiocitos neonatos basada en la transducción por medio de un adenovirus de la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada a un degron que lo hace ser

ubiquitinado, reconocido, desplegado, deubiquitinado y degradado por el proteosoma *in vivo* (Dong et al., 2004). Recientemente, se ha encontrado que proteínas altamente agregables, que forman cuerpos de inclusión, alteran globalmente al sistema ubiquitina–proteosoma, produciendo la acumulación de reporteros de actividad del proteosoma, aún cuando, no se observa inhibición de la actividad similar a quimotripsina determinada *in vitro* (Bennett et al., 2005). La estrategia demostrada por Dong et al sería una buena alternativa para investigar si en el cardiomiocito neonato sometido a condiciones de estrés ocurre la alteración del sistema ubiquitina–proteosoma a pesar de no estar inhibida la actividad tipo quimotripsina.

7.2. Formación de agresomas en el cardiomiocito

Anteriormente se mencionó que cuando la formación de cuerpos de inclusión es dependiente de microtúbulos, se les denomina agresomas (Johnston et al., 1998) los que viajan hacia el centrosoma mediante un sistema de transporte retrógrado (Johnston et al., 1998;Kopito, 2000) mediado por HDAC6 (Kawaguchi et al., 2003). En el cardiomiocito, los microtúbulos son los principales componentes del citoesqueleto y su disrupción ha sido descrita en procesos de isquemia cardiaca. Los microtúbulos son estructuras cilíndricas formadas por heterodímeros de α - y β -tubulina, los que se adicionan mediante hidrólisis del GTP. Cada monómero de α - y β -tubulina unen GTP, pero el GTP unido a β -tubulina se hidroliza. Los alcaloides de la Vinca, como Vinblastina se unen directamente al extremo creciente de los microtúbulos e induce la formación de paracristales de tubulina. Vinblastina inhibe la actividad GTPasa de la tubulina, disminuyendo el número de polímeros de tubulina (Calaghan et al., 2004). Además, la disrupción de los microtúbulos previene la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, impidiéndose la degradación de un agregado proteico (Webb et al., 2004). Los cuerpos de inclusión presentados en la [figura 7](#) efectivamente corresponden a agresomas, ya que al desestabilizar los microtúbulos se impide la formación de los agresomas ([figura 10](#)). Otra característica importante de los agresomas es el bajo número de copias, aspecto que se observó en la [figura 10](#), colocalizando con proteínas chaperonas (ej Hsp 70), como lo observado en la [figura 12](#). Colectivamente estos son los primeros hallazgos que demuestran que condiciones de estrés celular (privación de glucosa, estrés hiperosmótico, privación de aminoácidos o de suero) favorecen la formación de

agresomas en el cardiomiocito. Finalmente, experimentos adicionales deberán identificar la redistribución de filamentos intermedios, como desmina (Calaghan et al., 2004) en cardiomiocitos sometidos a condiciones de estrés.

Además de lo anteriormente mencionado, también llamó la atención que no se formara un único agresoma en el cardiomiocito (figuras 7 y 10), por lo que el paso siguiente consistió en investigar la distribución subcelular del centrosoma. Los resultados mostrados en la Figura 11 mostraron que el cardiomiocito no posee un centrosoma como tal, en comparación a la línea celular HEK293, y coincidentemente con lo observado por Kronebusch and Singer, quien lo identificó en la zona circumnuclear (Kronebusch and Singer, 1987). Así, el cardiomiocito al no poseer un centrosoma como tal no tiene un único punto focal en que se formen los agresomas, lo que podría explicar por qué se forma más de uno de ellos.

7.3. Relación proteosoma-autofagia-agresoma

Los agresomas pueden ser removidos por autofagia (Fortun et al., 2003; Iwata et al., 2005a; Rideout et al., 2004), ya que reclutan sistemas ATG (Iwata et al., 2005a). Por otro lado, la inducción de la autofagia, estimula que Rab24 cambie su ubicación subcelular desde la zona perinuclear, donde se presenta difusamente hacia autofagosomas (Munafo and Colombo, 2002) y hasta la fecha no existen antecedentes que vinculen Rab24 con agresomas. Rab24 presenta una expresión ubicua los tejidos, encontrándose principalmente en cerebro y corazón (Oikkonen et al., 1993). En la figura 13 encontramos que Rab24 se expresó en el cardiomiocito como dos isoformas, ya informadas en otras células postmitóticas diferenciadas (Erdman et al., 2000). Además, mediante inmunofluorescencia indirecta (figura 14) se demostró que los agresomas ricos en proteínas poliubiquitinadas colocalizaban con Rab24. Existe un reporte que indica que Rab24 no es poliubiquitinado (Maltese et al., 2002), indicando que Rab24 se recluta en los agresomas. Actualmente, sólo LC3 ha sido vinculado a agresomas (Iwata et al., 2005a; Iwata et al., 2005b). Sería interesante investigar si Rab24 se requiere para la formación del agresoma. En la actualidad no existen inhibidores farmacológicos de Rab24 disponibles en el mercado. Además, formas mutantes de Rab24 son blanco de inclusión nuclear (Maltese et al., 2002), por lo que sería necesario realizar experimentos que contemplen el silenciamiento de la expresión de la proteína con un RNA

interferente.

Al transducir cardiomiocito con la proteína LC3-GFP se confirmó que los agresomas colocalizaron con las vesículas autofágicas ([figura 15](#)). Similar hallazgo recientemente ya ha sido informado por otro grupo ([Iwata et al., 2005a](#); [Iwata et al., 2005b](#)), quienes propusieron que los agresomas reclutan sistemas ATG. Además LC3, al igual que Rab24, no se conjuga a ubiquitina ([Iwata et al., 2005b](#)), indicando que lo observado en la [figura 15](#) no es efecto de la ubiquitinación de LC3. Finalmente, estos resultados sugieren un vínculo entre autofagia y agresomas.

Al bloquear la autofagia con 3-MA, no se inhibió la formación de agresomas ([figura 17](#)). Este hallazgo se ve reforzado por evidencias que indican que hepatocitos de ratones transgénicos deficientes de ATG7 (una de las proteínas involucradas en la formación del sistema ATG12/ATG5) presentan acumulación de agregados de proteínas poliubiquitinadas ([Komatsu et al., 2005](#)). Además, la adición de 3-MA incrementó el nivel de proteínas poliubiquitinadas a las 6h de tratamiento ([figura 16](#)) en la fracción soluble a Tritón X-100. Los agresomas han sido definidos como agregados proteicos que presentan una baja solubilidad en solventes acuosos o detergentes ([Kopito, 2000](#)), aún cuando, el estudio de los agresomas se ha llevado a cabo mediante la sobreexpresión de una proteína en particular, altamente hidrofóbica, que presenta una tendencia natural a formar agregados de alto masa molecular (por sobre los 200 kDa). En nuestro modelo basado en cambiar las condiciones nutricionales del medio de cultivo, no se incrementó el nivel de proteínas poliubiquitinadas a las 18h de tratamiento, en la fracción insoluble a Tritón X-100 ([figura 16](#)). Este resultado se puede explicar a que los agresomas formados en nuestro sistema corresponde a un cóctel de proteínas de masa molecular variada (ver [figura 4.2](#)) no siendo un agresoma “limpio” generado por la sobreexpresión de una proteína, donde se observan acumulación de estas en fracciones insolubles. Por otro lado, es posible que las condiciones de obtención de la fracción insoluble no sean óptimas y se requieran condiciones más agresivas, como las utilizadas por [Egami et al.](#) quienes utilizaron una concentración de 1% de SDS e incubación de 1 h a 60 °C ([Egami et al., 2005](#)) para obtener dicha fracción.

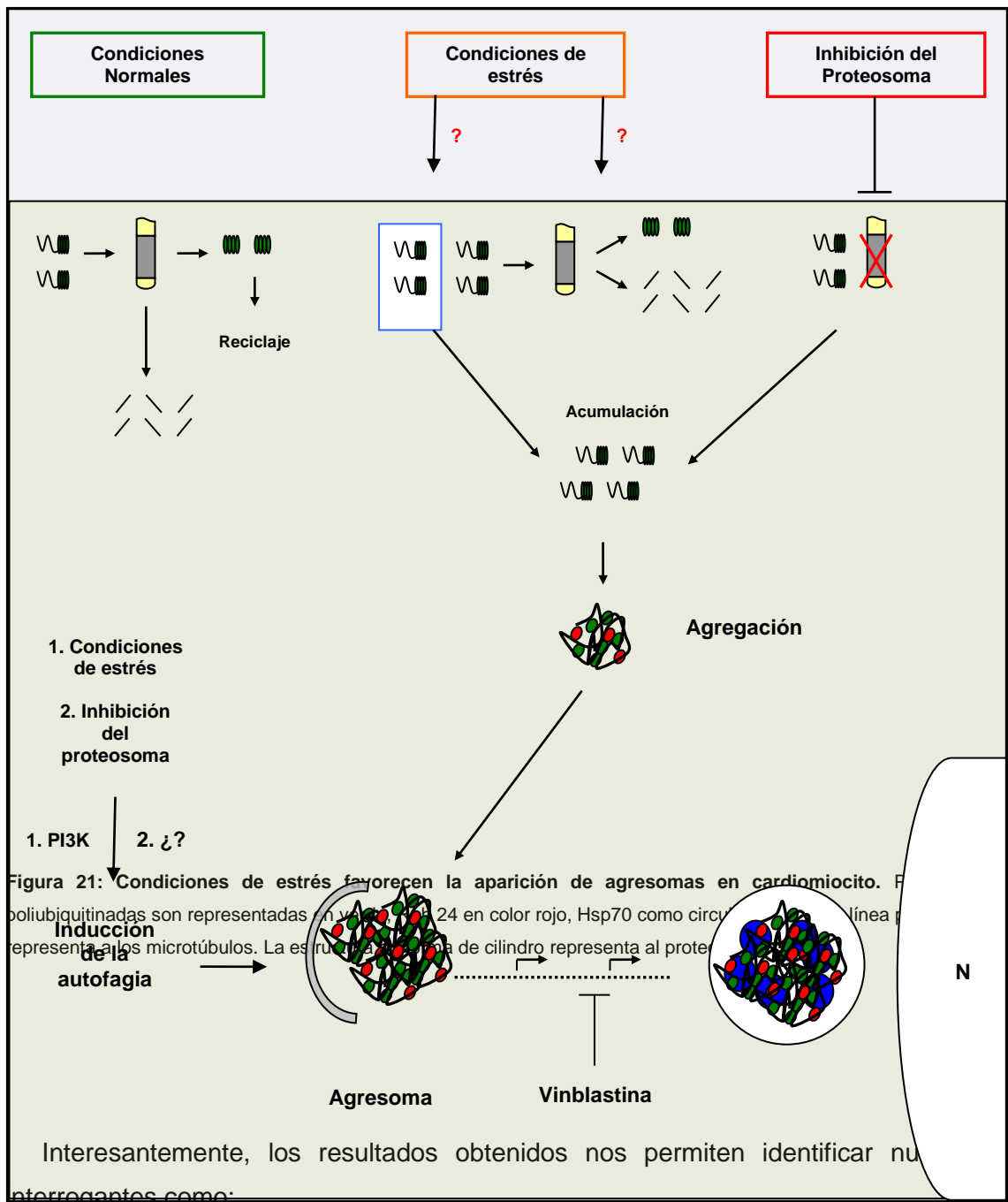
Al ocupar inhibidores del proteosoma a una concentración que inhiben

efectivamente el proteosoma en cardiomiocitos (Dong et al., 2004;Stangl et al., 2002), se observó que se forman agresomas enriquecidos en proteínas poliubiquitinadas ([figuras 18](#) y [19](#)). Hallazgos similares ya han sido descritos en otros modelos celulares (Harada et al., 2003;lwata et al., 2005b;lwata et al., 2005a;Johnston et al., 1998;Johnston and Madura, 2004;Kopito, 2000;Wigley et al., 1999;Wojcik and DeMartino, 2003), pero no en cardiomiocitos. Interesantemente, los agresomas formados por inhibición del proteosoma colocalizaron con Rab24 ([figuras 18](#) y [19](#)), indicando que los inhibidores del proteosoma inducen autofagia en el cardiomiocito. Hallazgos similares ya han sido observados en otros modelos celulares (Egami et al., 2005;lwata et al., 2005b;Rideout et al., 2004) ([figuras 18](#), [19](#) y [20C](#)). La inhibición del proteosoma incrementa la expresión del mRNA de Rab24, tanto en células PC12 diferenciadas, como en motoneuronas dañadas (Egami et al., 2005). En nuestro modelo se encontró que Rab24 colocalizó tanto en células sometidas a diferentes condiciones de estrés como en células sometidas a inhibidores del proteosoma ([figuras 14](#), [18](#) y [19](#)), sugiriendo que Rab24 se puede relacionar a una respuesta intracelular gatillada por estrés que genere la acumulación de proteínas poliubiquitinadas. Rab24 se ha propuesto como un direccionador de proteínas mal plegadas, generadas en el retículo endoplásmico, hacia rutas de degradación proteica (Olkkonen et al., 1993). Esta última afirmación abre la posibilidad a pensar que Rab24, no sólo decore vesículas autofágicas en conjunto a LC3 en nuestro sistema, sino que también actúe como una proteína cargo de agregados de proteínas poliubiquitinadas, de una manera parecida a HDAC6. Rab24 tiene particularidades que la hacen un miembro atípico de su familia de proteínas, como es el hidrolizar deficientemente GTP, experimentar una baja conjugación a grupos geranyl-geranyl y estar unida sólo en un 20% a estructuras insolubles, permaneciendo la mayor parte de la proteína en el citosol (Erdman et al., 2000). Estas características atípicas abren la posibilidad de que Rab24 presente un comportamiento de proteína cargo.

Finalmente, se investigó si la autofagia puede depurar a la célula de agresomas basados en los hallazgos hechos en neuronas corticales, las que frente a inhibición del proteosoma presentan grandes inclusiones de proteínas poliubiquitinadas. En estas neuronas, la activación de la autofagia conlleva la disolución de estos agregados (Rideout et al., 2004). Los cardiomiocitos presentan varias similitudes con las neuronas como es su incapacidad de experimentar división celular. Es

posible que algunos mecanismos de depuración existentes en neuronas pudieran también estar presentes en cardiomiocitos. Además, el corazón es uno de los órganos que presenta la mayor capacidad de sufrir autofagia (Kuma et al., 2004). Es así que encontramos que al inhibir al proteosoma e inducir la autofagia simultáneamente se produce la depuración de proteínas poliubiquitinadas (figura 20 D y E). Experimentos adicionales a esta memoria, como la cuantificación de imágenes sumado a ensayos de degradación de proteínas de vida media larga (Mizushima, 2004) ayudarán a reforzar este resultado.

Finalmente, los resultados permiten plantear el siguiente modelo. En condiciones normales, proteínas poliubiquitinadas son degradadas a través del proteosoma. En cambio, en condiciones de estrés la capacidad proteolítica del proteosoma no cambia, pero se ve sobrepasado por proteínas poliubiquitinadas. Este fenómeno, aparentemente no se debe al incremento de las proteínas poliubiquitinadas ni a alguna alteración en el sistema de conjugación de la ubiquitina. Las proteínas que sobrepasan la capacidad proteolítica del proteosoma tienden a acumularse. Cuando se emplean inhibidores específicos del proteosoma también se produce la acumulación de las proteínas poliubiquitinadas y a continuación se agregan y forman un agrosoma. Paralelamente, las condiciones de estrés utilizadas y la inhibición del proteosoma inducen la autofagia en el cardiomiocito, por un mecanismo dependiente de la vía de las fosfatidilinositol 3-quinasas (PI3K) (Toro B, 2005) y por un mecanismo desconocido hasta la fecha, respectivamente. El agrosoma formado, posee además de proteínas poliubiquitinadas Hsp70 (círculos azules). El agrosoma es encerrado por una vesícula autofágica, viajando a través de los microtúbulos hacia la zona perinuclear, donde pueden ser degradados.



- ¿Qué proteínas son las que se agregan?
- ¿La agregación es un fenómeno específico?
- ¿Se puede modular farmacológicamente?
- ¿La agregación produce depleción de proteínas vitales de algunos procesos celulares?
- ¿Se altera la estabilidad del proteosoma?

¿Está relacionada la aparición de los agregomas con cambios en la viabilidad celular?

Esta última interrogante es desarrollada a continuación.

7.4. Perspectivas en el estudio de agregomas en el cardiomiocito: La viabilidad celular.

En nuestro Laboratorio se ha determinado que la privación de glucosa, de aminoácidos, de suero o exposición a estrés hiperosmótico, gatillan la muerte del cardiomiocito, entre un 40-60% tras 18h de tratamiento (Toro B, 2005). En la [figura 14](#) se muestra que la aparición de los agregomas ocurre tras 18h de tratamiento. Nuestras estimaciones indican que a las 6h de tratamiento aproximadamente el 40% de las células presentan agregados de proteínas poliubiquitinadas ampliamente dispersos en el citosol, reduciéndose esta cifra a las 18h de tratamiento, correlacionándose con la caída en la viabilidad celular. Además, existe una población celular que depura los agregomas a través de autofagia (ver [figura 20 D](#) y [E](#)) y otra población que no es capaz de hacerlo y presenta agregomas a las 18 y 24h de tratamiento (ver [figura 14](#)). Resulta interesante relacionar ambos fenómenos que ocurren en el cardiomiocito. Al respecto, la literatura cita que la disrupción de los microtúbulos previene la formación de los agregomas, pero no evita la toxicidad y la caída en la viabilidad celular, generada por la sobreexpresión de una forma truncada del receptor de andrógenos (Taylor et al., 2003). En un modelo celular de Enfermedad de Parkinson, la inhibición de las caspasas no alteró el número de células con agregomas, existiendo principalmente células que son agregoma-positivo/apoptosis-negativa, indicando que la formación de agregomas no está directamente relacionada con la muerte por apoptosis, sino con la supervivencia (Tanaka et al., 2004). La pérdida de HDAC6, responsable del viaje de los agregomas a través de los microtúbulos, causa hipersensibilidad a que proteínas desensambladas induzcan estrés que resulta en apoptosis (Kawaguchi et al., 2003). La disminución en la acumulación de agregomas, acompañado por la disminución de la viabilidad celular, implica que la acumulación de agregomas pueden ser citoprotectores, en un modelo de cardiomiopatía relacionada a desmina (Sanbe et al., 2005). El tratamiento de neuronas corticales con lactacistina produce neuronas con agregados de proteínas poliubiquitinadas, pero que no presentan

características apoptóticas (Rideout et al., 2004). Además, la inducción de Rab24 junto con LC3 puede ser crucial en la promover la degradación de proteínas mal plegadas y las innecesarias con el fin de reciclar aminoácidos limitantes y sintetizar nuevas proteínas que son necesarias para respuestas de sobrevida (Egami et al., 2005). Experimentos posteriores a esta memoria como, el doble marcaje de agrosomas y núcleos apoptóticos, estudios de viabilidad con agentes disruptores de microtúbulos y el balance entre rutas de transducción de señales de sobrevida y muerte, ayudarán a determinar si los agrosomas tienen un papel protector o mediador de muerte en el cardiomiocito.

8. CONCLUSIONES

1.- Condiciones de estrés como la privación de glucosa, el estrés hiperosmótico por sorbitol, la privación de aminoácidos y la privación de suero, no afectan la actividad similar a quimotripsina del proteosoma.

2.- Condiciones de estrés favorecen la aparición de agrosomas en el 72

cardiomiocito.

3.- La inhibición del proteosoma induce la formación de agresomas y autofagia, donde los agresomas son removidos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aki T, Yamaguchi K, Fujimiya T, and Mizukami Y. 2003. Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2. *Oncogene* 22:8529-8535.
2. Bennett E, Bence N, Jayakumar R, and Kopito R. 2005. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol. Cell* 17:351-365.
3. Bogoyevitch M, Ketterman A, and Sugden P. 1995. Cellular stresses

differentially activate c-Jun N-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* 270:29710-29717.

4. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
5. Bulteau A, Lundberg K, Humphries K, Sadek H, Szweda P, Friguet B, and Szweda L. 2001. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J. Biol. Chem.* 276:30057-30063.
6. Calaghan S, Le Guennec J, and White E. 2004. Cytoskeletal modulation of electrical and mechanical activity in cardiac myocytes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 84:29-59.
7. Ciechanover A. 2005. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death. Differ.* 12:1178-1190.
8. Ciechanover A, and Ben Saadon R. 2004. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol.* 14:103-106.
9. Ciechanover A, and Schwartz A. 2004. The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim. Biophys. Acta* 1695:3-17.
10. Cook J, and Chock P. 1995. Phosphorylation of ubiquitin-activating enzyme in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:3454-3457.
11. DICTENBERG J, ZIMMERMAN W, SPARKS C, YOUNG A, VIDAIR C, ZHENG Y, CARRINGTON W, FAY F, and DOXSEY S. 1998. Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J. Cell Biol.* 141:163-174.
12. Dong X, Liu J, Zheng H, Glasford J, Huang W, Chen Q, Harden N, Li F, Gerdes A, and Wang X. 2004. In situ dynamically monitoring the proteolytic function of the ubiquitin-proteasome system in cultured cardiac myocytes. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 287:H1417-H1425.
13. Egami Y, Kiryu-Seo S, Yoshimori T, and Kiyama H. 2005. Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337:1206-1213.
14. Elsasser A, Vogt A, Nef H, Kostin S, Mollmann H, Skwara S, Bode C, Hamm C, and Schaper J. 2004. Human hibernating myocardium is jeopardized by apoptotic and autophagic cell death. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43:2191-2199.
15. Elsasser S, Schmidt M, and Finley D. 2005. Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 398:353-363.
16. Erdman R, Shellenberger K, Overmeyer J, and Maltese W. 2000. Rab24 is

an atypical member of the Rab GTPase family. Deficient GTPase activity, GDP dissociation inhibitor interaction, and prenylation of Rab24 expressed in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 275:3848-3856.

17. Fenteany G, and Schreiber S. 1998. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.* 273:8545-8548.
18. Fortun J, Dunn W, Joy S, Li J, and Notterpek L. 2003. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *J. Neurosci.* 23:10672-10680.
19. Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher E, and Sztul E. 1999. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J. Cell Biol.* 146:1239-1254.
20. Glickman M, and Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82:373-428.
21. Harada M, Kumemura H, Omary M, Kawaguchi T, Maeyama N, Hanada S, Taniguchi E, Koga H, Suganuma T, Ueno T, and Sata M. 2003. Proteasome inhibition induces inclusion bodies associated with intermediate filaments and fragmentation of the Golgi apparatus. *Exp. Cell Res.* 288:60-69.
22. Hernandez F, Diaz-Hernandez M, Avila J, and Lucas J. 2004. Testing the ubiquitin-proteasome hypothesis of neurodegeneration in vivo. *Trends Neurosci.* 27:66-69.
23. Herrmann J, Ciechanover A, Lerman L, and Lerman A. 2004. The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases-a hypothesis extended. *Cardiovasc. Res.* 61:11-21.
24. Hicke L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:195-201.
25. Hu B, Martone M, Jones Y, and Liu C. 2000. Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 20:3191-3199.
26. Iwata A, Christianson J, Bucci M, Ellerby L, Nukina N, Forno L, and Kopito R. 2005a. Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:13135-13140.
27. Iwata A, Riley B, Johnston J, and Kopito R. 2005b. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J. Biol. Chem.* 280:40282-40292.
28. Jensen J, Bates P, Yang M, Vierstra R, and Weissman A. 1995. Identification of a family of closely related human ubiquitin conjugating enzymes. *J. Biol. Chem.* 270:30408-30414.
29. Johnston J, Dalton M, Gurney M, and Kopito R. 2000. Formation of high

molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:12571-12576.

30. Johnston J and Madura K. 2004. Rings, chains and ladders: ubiquitin goes to work in the neuron. *Prog. Neurobiol.* 73:227-257.
31. Johnston J, Ward C, and Kopito R. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143:1883-1898.
32. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, and Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19:5720-5728.
33. Kawaguchi Y, Kovacs J, McLaurin A, Vance J, Ito A, and Yao T. 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115:727-738.
34. Kisselev A and Goldberg A. 2005. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol.* 398:364-378.
35. Klionsky D and Emr S. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717-1721.
36. Knaapen M, Davies M, De Bie M, Haven A, Martinet W, and Kockx M. 2001. Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 51:304-312.
37. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, and Chiba T. 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* 169:425-434.
38. Kopito R. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10:524-530.
39. Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler H, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn W, and Schaper J. 2003. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ. Res.* 92:715-724.
40. Kronebusch P, and Singer S. 1987. The microtubule-organizing complex and the Golgi apparatus are co-localized around the entire nuclear envelope of interphase cardiac myocytes. *J. Cell Sci.* 88 (Pt 1):25-34.
41. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiisa T, and Mizushima N. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432:1032-1036.
42. Lee D and Goldberg A. 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for

cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8:397-403.

43. Liu Z, Miers W, Wei L, and Barrett E. 2000. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in heart vs skeletal muscle: effects of acute diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276:1255-1260.
44. Maltese W, Soule G, Gunning W, Calomeni E, and Alexander B. 2002. Mutant Rab24 GTPase is targeted to nuclear inclusions. *BMC. Cell Biol.* 3:25.
45. Mizushima N. 2004. Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:2491-2502.
46. Munafo D and Colombo M. 2002. Induction of autophagy causes dramatic changes in the subcellular distribution of GFP-Rab24. *Traffic.* 3:472-482.
47. Ohsumi Y. 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:211-216.
48. Olkkonen V, Dupree P, Killisch I, Lutcke A, Zerial M, and Simons K. 1993. Molecular cloning and subcellular localization of three GTP-binding proteins of the rab subfamily. *J. Cell Sci.* 106 (Pt 4):1249-1261.
49. Ouyang Y and Hu B. 2001. Protein ubiquitination in rat brain following hypoglycemic coma. *Neurosci. Lett.* 298:159-162.
50. Passmore L and Barford D. 2004. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.* 379:513-525.
51. Peterson G. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83:346-356.
52. Petiot A, Pattingre S, Arico S, Meley D, and Codogno P. 2002. Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27:431-441.
53. Pickart C and Eddins M. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1695:55-72.
54. Rajapurohitam V, Bedard N, and Wing S. 2002. Control of ubiquitination of proteins in rat tissues by ubiquitin conjugating enzymes and isopeptidases. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 282:E739-E745.
55. Rechsteiner M and Hill C. 2005. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* 15:27-33.
56. Rideout H, Lang-Rollin I, and Stefanis L. 2004. Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:2551-2562.
57. Sanbe A, Osinska H, Saffitz J, Glabe C, Kaye R, Maloyan A, and Robbins J.

2004. Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: a cardiac amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:10132-10136.
58. Sanbe A, Osinska H, Villa C, Gulick J, Klevitsky R, Glabe C, Kaye R, and Robbins J. 2005. Reversal of amyloid-induced heart disease in desmin-related cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:13592-13597.
59. Schwartz A, Brandt R, Geuze H, and Ciechanover A. 1992. Stress-induced alterations in autophagic pathway: relationship to ubiquitin system. *Am. J. Physiol* 262:C1031-C1038.
60. Schwartz D and Hochstrasser M. 2003. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem. Sci.* 28:321-328.
61. Seglen P and Gordon P. 1982. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79:1889-1892.
62. Stangl K, Gunther C, Frank T, Lorenz M, Meiners S, Ropke T, Stelter L, Moobed M, Baumann G, Kloetzel P, and Stangl V. 2002. Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway induces differential heat-shock protein response in cardiomyocytes and renders early cardiac protection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:542-549.
63. Tanaka M, Kim Y, Lee G, Junn E, Iwatsubo T, and Mouradian M. 2004. Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J. Biol. Chem.* 279:4625-4631.
64. Tanida I, Ueno T, and Kominami E. 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:2503-2518.
65. Taylor J, Tanaka F, Robitschek J, Sandoval C, Taye A, Markovic-Plese S, and Fischbeck K. 2003. Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum. Mol. Genet.* 12:749-757.
66. Toro B. Diferentes tipos de estrés celular activan la autofagia del cardiomiocito (memoria para optar al título de Bioquímico), Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2005.
67. Wang C and Klionsky D. 2003. The molecular mechanism of autophagy. *Mol. Med.* 9:65-76.
68. Webb J, Ravikumar B, and Rubinsztein D. 2004. Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:2541-2550.
69. Weekes J, Morrison K, Mullen A, Wait R, Barton P, and Dunn M. 2003. Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics.* 3:208-216.

70. Wigley W, Fabunmi R, Lee M, Marino C, Muallem S, DeMartino G, and Thomas P. 1999. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J. Cell Biol.* 145:481-490.
71. Wojcik C and DeMartino G. 2003. Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35:579-589.
72. Wolf D and Hilt W. 2004. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. Biophys. Acta* 1695:19-31.
73. Yan L, Vatner D, Kim S, Ge H, Masurekar M, Masover W, Yang G, Matsui Y, Sadoshima J, and Vatner S. 2005. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:13807-13812.
74. Yoshimori T. 2004. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:453-458.

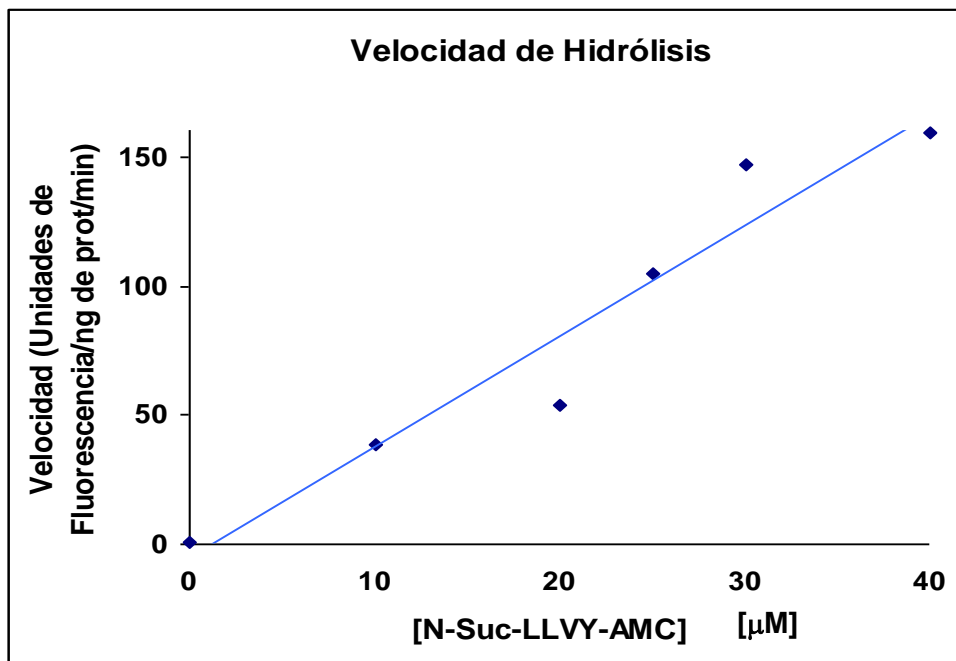
10. ANEXOS

Desde el descubrimiento del proteosoma, hace más de dos décadas, sustratos fluorogénicos han sido utilizados para determinar la actividad del proteosoma. Ellos permiten realizar ensayos de actividad en extracto crudo con una adecuada precisión y sensibilidad en el ensayo. Estos sustratos son péptidos formados por 4 aminoácidos fusionado a un reportero fluorescente en el extremo C-terminal. El proteosoma hidroliza el puente amido existente entre un aminoácido y el fluoróforo, resultando en la liberación de un producto altamente fluorescente, el cual es

posible monitorizar mediante espectrofluorimetría, siendo la fluorescencia emitida por la reacción directamente proporcional a la hidrólisis del sustrato por parte del proteosoma (Kisselev and Goldberg, 2005). La hidrólisis de estos sustratos por parte del proteosoma es dependiente de ATP y puede ser inhibida específicamente por inhibidores del proteosoma (Dong et al., 2004). El péptido N-Suc-LLVY-AMC, es el sustrato de elección para la determinación de la actividad similar a quimotripsina, por ser altamente específico y presentar una proteólisis no proteosomal muy baja determinada en extracto crudo (Kisselev and Goldberg, 2005).

1. Determinación de la velocidad de hidrólisis del péptido sustrato N-Suc-LLVY-AMC.

El ensayo se llevó a cabo tomando un lisado celular que contenía 10 µg de proteínas. El lisado se incubó con ATP 2 mM y concentraciones crecientes del sustrato N-Suc-LLVY-AMC, desde 10 hasta 40 µM. El volumen final de la reacción fue de 200 µL. La reacción se realizó en un baño termorregulado a 37° C por 40 min y se detuvo la reacción por la adición de etanol absoluto hasta completar un volumen final de 500 µL. Finalmente, se enrasó con agua destilada hasta completar 2 mL y se realizó la lectura en un fluorímetro Perkin Elmer Lumiscence spectrometer L550 B/29, de acuerdo a lo señalado en Materiales y Métodos. Los resultados de velocidad de hidrólisis se expresaron como las unidades de fluorescencia emitidas normalizadas por ng de proteína por min.

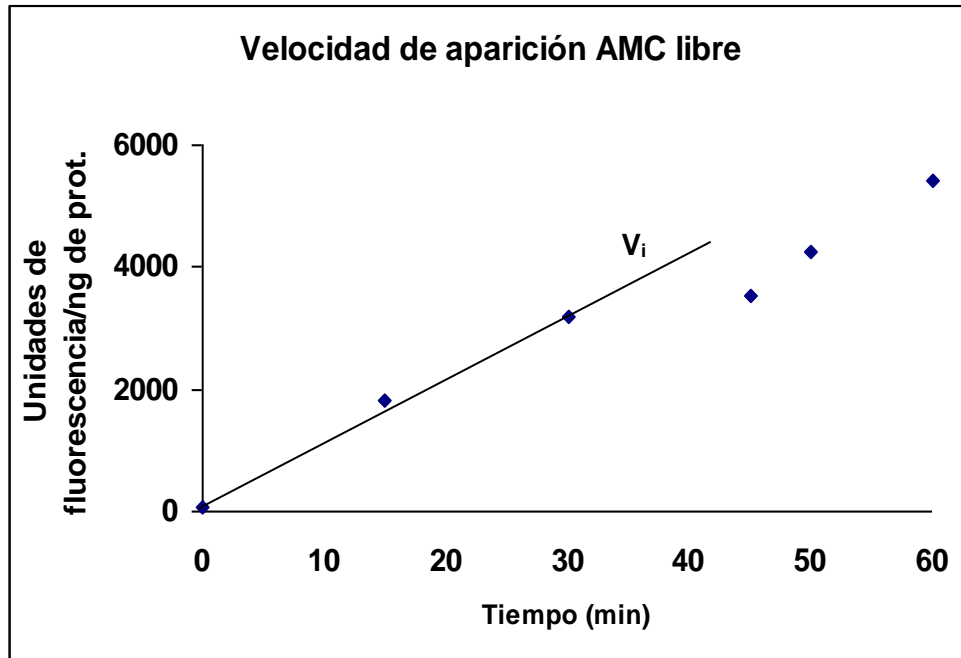


En condiciones de velocidad máxima (V_{max}), la velocidad de la reacción es dependiente de la concentración de enzima (expresándose esta relación como una recta con intercepto cero) e independiente de la concentración de sustrato, por lo que la cuantificación de la formación de un producto en V_{max} es una medida representativa de la cantidad de enzima presente. En la figura se observa una relación lineal con un intercepto muy cercano al origen, indicando que concentraciones de N-Suc-LLVY-AMC, de orden micromolar, son concentraciones que logran saturar al proteosoma. Decidimos elegir la concentración de 25 μM , por encontrarse en un rango medio de la gráfica anteriormente presentada y además por haber sido utilizada por otro grupo en lisados de cardiomiocitos neonatos (Dong et al., 2004).

2.- Determinación de las condiciones de ensayo para la cuantificación de la actividad tipo quimotripsina, utilizando N-Suc-LLVY-AMC como sustrato.

Se determinó el tiempo de reacción enzimática para el ensayo de actividad utilizando un lisado celular que contenía 10 μg de proteínas, ATP (2 mM) y N-Suc-LLVY-AMC 25 μM , en un baño termostático a 37° C, en tiempos que comprendidos desde los 0 (DMSO) hasta los 60 min de reacción. Finalizado el periodo de incubación la reacción se detuvo con la adición de etanol absoluto, se

enrasó con agua destilada y se realizó la medición por espectrofluorimetría.



En el gráfico se observa que las condiciones de velocidades iniciales se mantienen en aproximadamente los 30 min iniciales. En la literatura se describe este ensayo utilizando 90 min de ensayo (Dong et al., 2004). Debido a estas razones se consideró que para todos los ensayos realizados en esta memoria se utilizó 37°C y 40 min de ensayo.