

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**PAPEL DE HERP EN LA DEGRADACIÓN DE BECLIN-1
MEDIANTE EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSOMA**

TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE
PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA DE ESPECIALIZACIÓN EN
BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS Y BIOTECNOLOGÍA Y
MEMORIA DE TÍTULO DE BIOQUÍMICO POR:

DAMIÁN GATICA MIZALA

Directores de Tesis

Dr. Sergio Lavandero G.

Dra. Zully Pedrozo C.

2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato:

DAMIÁN GATICA MIZALA

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica de Proteínas y Biotecnología y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día 15 de Noviembre del 2012.

Directores de Tesis

Dr. Sergio Lavandero

Dra. Zully Pedrozo

Comisión Informante de Tesis

Dra. María Antonieta Valenzuela

Dra. Cecilia Rojas

Dr. Sergio Lobos

A mi Abuelo Moisés

PUBLICACIONES

Bravo R, Gutierrez T, Paredes F, **Gatica D**, Rodriguez AE, Pedrozo Z, Chiong M, Parra V, Quest AFG, Rothermel BA, Lavandero S. Organelle in Focus; Endoplasmic Reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell Biol.* 44:16-20, 2012

Troncoso R, Vasquez-Trincado C, del Campo A, **Gatica D**, Morales P, Paredes F, Gutierrez T, Lopez-Crisosto C, Torrealba N, Garcia L, Diaz-Araya G, Battiprolu PK, Nemchenko A, Ferdous A, Gillette TG, Hill JA, Lavandero S. "Regulation of autophagy by Insulin/IGF-1 signaling pathways" in *Autophagy: Principles, Regulation and Roles in Disease*. Nova Publishers. 2012

Bravo R, Parra V, **Gatica D**, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E, Quest AFG, Lavandero S. endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* (en prensa, 2013).

Quiroga C, **Gatica D**, Paredes F, Bravo R, Troncoso R, Pedrozo Z, Rodriguez AE, Toro B, Chiong M, Vicencio JM, Hetz S, Lavandero S. Herp depletion protects from protein aggregation by up-regulation of autophagy during acute nutritional stress. (manuscrito en preparación, 2012).

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Gatica D, Quiroga C, Paredes F, Pedrozo Z, Lavandero S. Herp controls beclin-1 degradation by the ubiquitin-proteasome system. XXXIV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Valdivia, Chile, 2011.

Gatica D, Paredes F, Quiroga C, Troncoso R, Pedrozo Z, Lavandero S. Herp regulates autophagy through Beclin-1 lys⁴⁸ poly-ubiquitination and proteasomal degradation. XXXV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile, 2012.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis de Magíster se realizó bajo las direcciones de la Dra Zully Pedrozo y el Dr. Sergio Lavandero en el Laboratorio de Transducción de Señales del Centro de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile y contó con el financiamiento de los siguientes proyectos:

- Proyecto FONDAP 1501006, CONICYT, CHILE (a S.L.)
- Proyecto Anillo de investigación en Ciencia y Tecnología ACT 1111, CONICYT, Chile (a S.L.)

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada me gustaría agradecer a mis padres Alejandra y Jaime; a mi hermana Camila y mi mamadre Olga por todo el apoyo demostrado a través de la carrera. No todo el mundo puede llegar a su casa un día, decir que quiere estudiar Bioquímica y recibir una sonrisa a cambio.

Quiero dar gracias a mis directores de Tesis, el Dr Sergio Lavandero y la Dra Zully Pedrozo, que durante todo este proceso me demostraron su confianza y disposición.

A los miembros de mi comisión, las Dras. María Antonieta Valenzuela y Cecilia Rojas; y el Dr Sergio Lobos por su espíritu de diálogo que permitió que esta Tesis fuera posible.

A todos mis compañeros de laboratorio, por su permanente disposición a compartir, conversar, discutir y por sobre todas las cosas, a reír en cada momento.

A mis amigos de carrera y futuros colegas, Bernardo, Cristian, Fernando, Marianne, Pablo B, Pablo M, Valentina y en especial a Sebastián. Aun que ahora estemos alejados, se que con solo juntarnos nuevamente nos reiremos como siempre.

También quisiera agradecer a todos mis amigos del colegio, en especial a Agustín, Alberto, Alejandro, Fernanda, Paula, Sofía y Tomás. Gracias por su cariño y amistad que me acompaña y me continuará acompañando siempre.

Quisiera agradecer especialmente a Javiera, por toda su alegría y paciencia. No cualquiera puede entender que su pololo se pase todo el día “jugando con agua” en el laboratorio.

Por último quisiera agradecer a quien dedico esta tesis, mi abuelo Moisés. Tata como Ud. no hay nadie. Para mí es un orgullo poder decir que Ud. es mi abuelo. Gracias por enseñarme lo que es la Biología, por reírse de que estudie en la Chile y soy de la católica, gracias por el mago y por los dulces, gracias por siempre poner primero a su familia. Sin Ud. yo no estaría donde estoy ahora, no hubiera estudiado lo que estudie y no sería quien soy. Gracias Tata, gracias por ser mi abuelo.

1. INDICE GENERAL

1. INDICE GENERAL	8
2. RESUMEN.....	10
3. SUMMARY	12
4. ABREVIACIONES.....	14
5. INTRODUCCIÓN.....	17
5.1 Autofagia.....	17
5.1.1 Complejo PI3K-III	20
5.1.2 Beclin-1	21
5.2 Retículo Endoplásmico	23
5.2.1 Estrés de retículo y la respuesta UPR.....	24
5.2.2 ERAD	25
5.2.3 Sistema Ubiquitina-Proteosoma.....	27
5.2.4 Herp.....	30
6. HIPÓTESIS	33
7. OBJETIVO GENERAL	33
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
9.1 Reactivos generales	34
9.2 Líneas celulares.....	35
9.3 Inducción de la autofagia, del estrés de RE y la inhibición proteosomal	35
9.4 Microscopía	35
9.5 Western blot.....	36
9.6 Inmunoprecipitación	37
9.7 Silenciamiento mediante siRNA	37
9.8 Transfección transitoria.....	38
9.9 Producción de lentivirus e infección lentiviral	38
9.10 Expresión de los resultados y análisis estadístico.....	40
10. RESULTADOS	41
10.1 Efecto de la disminución de Herp en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1	41

10.2	Relación entre el aumento de Beclin-1 en las células KD de Herp y su degradación proteosomal.....	49
10.3	Efecto de la ubiquitin ligasa Hrd-1 en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1	53
10.4	Efecto de la disminución de Herp y Hrd-1 en los niveles de Beclin-1 y la activación de la autofagia.....	56
11.	DISCUSIÓN	63
11.1	Poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 dependiente de Herp	63
11.2	Degradación proteosomal de Beclin-1	65
11.3	Efecto de Hrd-1 en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 dependiente de Herp.....	67
11.4	Efecto de Herp y Hrd-1 en la activación de la autofagia	68
12.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	72
13.	CONCLUSIONES	74
14.	REFERENCIAS	75

2. RESUMEN

La autofagia es un proceso fisiológico clave para la supervivencia celular frente a diferentes tipos de estrés. Este proceso degradativo consiste en el reclutamiento de proteínas, lípidos y organelos completos en vesículas de doble membrana para la posterior degradación lisosomal de su contenido.

Una de las proteínas más importantes en la regulación de la autofagia es Beclin-1/ATG6. En condiciones basales, Beclin-1 se encuentra unido a Bcl-2/Bcl-XL. La disociación de estas proteínas es indispensable para la activación de la autofagia. Tanto Beclin-1 como Bcl-2 son reguladas por modificaciones post-traduccionales que permiten su disociación. Dentro de estas modificaciones la poli-ubiquitinación en Lys63 de Beclin-1 promueve su disociación de Bcl-2 y la activación de la autofagia.

Por otra parte, tanto la generación de estrés de retículo endoplasmático (RE) como la acumulación de agregados proteicos inducen autofagia. La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) restablece el normal funcionamiento del RE mediante distintas vías de señalización como la vía de degradación de proteínas del RE (ERAD), la cual elimina las proteínas mal plegadas dentro del RE al ser retrotranslocadas hacia el citoplasma y poli-ubiquitinarlas para su degradación proteosómica. La acción del ERAD ocurre a través de un complejo formado por diferentes proteínas, entre ellas Herp y la ubiquitina ligasa Hrd-1/Synoviolina.

El sistema ubiquitina-proteosoma modifica post-traduccionamente proteínas, uniéndolas covalentemente a una pequeña proteína denominada ubiquitina. La unión de varias subunidades de ubiquitina unidas por su Lys48 es conocida como poli-ubiquitinación en Lys48 y está generalmente asociada a la degradación proteosómica de la proteína marcada. Por otra parte, otros tipos de cadenas de poli-ubiquitina unidas por su Lys63 tendrían funciones de señalización.

Herp es una proteína integral de membrana asociada al RE, la cual aumenta significativamente sus niveles en respuesta al estrés del RE y activarse la vía UPR. Herp posee un dominio análogo a ubiquitina (ULD), el cual lo vincularía al ERAD. El dominio ULD de Herp regula positivamente la poli-ubiquitinación dependiente de Hrd-1

y de esta manera aumenta la degradación de sustratos específicos de esta enzima. Estudios recientes en nuestro laboratorio mostraron que Herp actúa como un regulador negativo de la autofagia y que los niveles de Beclin-1 aumentan significativamente en su ausencia. El objetivo de esta tesis fue establecer el mecanismo a través del cual Herp regula negativamente la autofagia.

Con este fin se prepararon células HeLa “knock-down” (KD) para Herp mediante la expresión de un shRNA específico. También se utilizaron siRNA específicos para Herp con el fin de reducir los niveles de esta proteína en células HeLa “wild-type”.

Los resultados obtenidos muestran que Herp regula positivamente la poli-ubiquitinación en Lys48 de Beclin-1. Ni la privación de glucosa ni la disminución de Hrd-1 mediante un siRNA específico produjeron diferencias en la poli-ubiquitinación de Beclin-1. La inhibición del proteosoma con MG132 indujo un aumento en la cantidad de Beclin-1 en células controles, mientras que las células Herp KD no presentaron diferencias con respecto al control, sugiriendo que la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 conduce a su degradación proteosomal. Sin embargo al activar la autofagia por privación de glucosa las células tratadas con el siRNA de Herp o siRNA de Herp y Hrd-1 en conjunto mostraron una tendencia al aumento en la autofagia, mientras que las células transfectadas con el siRNA de Hrd-1 mostraron una disminución de la activación de la autofagia.

En conclusión los resultados solo comprueban parcialmente la hipótesis propuesta. Si bien se observó que Herp regula negativamente la autofagia mediante la poli-ubiquitinación en Lys48 de Beclin-1 y su consiguiente degradación proteosomal, la ubiquitin ligasa Hrd-1 no sería la encargada de la poli-ubiquitinación en Lys48 dependiente de Herp.

3. SUMMARY

Autophagy is a key physiological process for cell survival under different types of stress. This process consists in the recruitment of various cytoplasmatic components such as proteins, lipids and organelles into double-membrane vesicles which fuse with lysosomes enabling the degradation of its content.

One of the most important regulatory proteins in autophagy is Beclin-1/ATG6. In basal conditions, Beclin-1 interacts with its repressor protein Bcl-2/Bcl-XL. The dissociation of these two proteins is indispensable for autophagy initiation and development. Both Beclin-1 and Bcl-2 are subjected to different post-translational modifications, which regulate their dissociation. Among these modifications, the Lys63 poly-ubiquitination of Beclin-1 promotes dissociation from Bcl-2 and autophagy activation.

The generation of endoplasmic reticulum (ER) stress and the subsequent accumulation of misfolded proteins is a well known autophagy activating signal. In order to maintain homeostasis to the ER during stress, the unfolded protein response (UPR) is activated. The UPR accomplishes this task by a series of signaling pathways such as ER-associated protein degradation (ERAD), which degrades misfolded proteins inside the ER by retro-translocation of them to the cytoplasm and poly-ubiquitination for proteasomal degradation. ERAD is controlled by a series of proteins in the ER such as Herp and the ubiquitin-ligase Hrd-1/Synoviolin.

The ubiquitin-proteasome system modifies proteins by the attachment of the small protein ubiquitin. Attaching several subunits of ubiquitin to each other by their Lys48 is called Lys48 poly-ubiquitination and is normally recognized as a signal for proteasome degradation. In the other hand, Lys63 poly-ubiquitination of proteins is related to other signaling process.

Herp is an integral ER protein, whose levels are significantly increased during ER stress and UPR activation. Herp contains an ubiquitin-like domain (ULD) which has been associated with ERAD. Herp ULD domain controls Hrd-1 dependant poly-ubiquitination, increasing the poly-ubiquitination and proteasomal degradation of specific substrates of

Hrd-1. Our recent studies have shown that Herp is a novel negative regulator of autophagy and Beclin-1 levels are up-regulated in the absence of Herp. The aim of the present work was to establish how Herp negatively regulates autophagy.

To this end, Herp knock-down (KD) HeLa cells were prepared by expressing a specific shRNA. Specific siRNA were also used to silence Herp expression in HeLa wild-type cells.

Our results show Herp positively regulates Beclin-1 Lys48 poly-ubiquitination. Both glucose deprivation and Hrd-1 siRNA treatment did not have any effect in Beclin-1 poly-ubiquitination. Proteasome inhibition with MG132 induces Beclin-1 levels in control cells, while Herp KD cells do not show any differences. These data suggest that Beclin-1 lysine-48 poly-ubiquitination leads to its proteasome degradation. Glucose deprivation showed an increase in autophagy activation cells treated with a Herp siRNA or Hrd-1 and Herp siRNA treated cells. However, Hrd-1 siRNA treatment alone showed impaired autophagy activation.

In conclusion, our results only prove the hypothesis partially. The results suggest Herp negatively regulates autophagy through Beclin-1 Lys48 poly-ubiquitination and consequent proteasomal degradation, but the ubiquitin ligase Hrd-1 would not be responsible Herp mediated Beclin-1 Lys48 poly-ubiquitination.

4. ABREVIACIONES

AMBRA1	Activating molecule in Beclin-1 regulated autophagy
AMPK	5'-AMP activated protein kinase
APS	Persulfato de amonio
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Albúmina de suero bovino
DAPK	Death associated protein kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
eIF2 α	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha
EN-G	Estrés nutricional por privación de Glucosa
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation
ERSE I-II	ER stress response element type I-II
FBS	Suero fetal bovino
GFP	Proteína fluorescente verde
Herp	Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein
IP	Ensayo de Inmunoprecipitación
IRE1 α	Inositol-requiring protein 1 alpha
JNK1	c-Jun N-terminal kinase 1
KO	Knock out
KD	Knock down
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulo
Luc	Luciferasa
Lys48	Lisina 48
mTOR	mammalian Target of rapamycin
nM	Nanomolar
NEDD4	Neuronal precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4

PBS	Tampón fosfato salino
PERK	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase
PI3K-III	Class III phosphatidylinositol 3-kinase
PI ₃ P	Fosfoinositol 3' fosfato
PMSF	Fenilmetilsulfonifluoruro
RE	Retículo endoplasmático
RUBICON	Run domain Beclin-1 interacting cystein-rich containing protein
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes
SEM	Error estándar de la media
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
p62/SQTSM-1	Secuestrosoma -1
TBS	Tampón Tris salino
TBS-T	Tampón Tris salino-Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
Tg	Tapsigargina
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
UB Lys48	Anticuerpo anti poli-ubiquitina unida por lisina 48
ULD	Dominio análogo a ubiquitina
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
UPRE	Elemento de respuesta a UPR
UVRAG	UV-radiation resistance associated gene
VPS 15	Vacuolar sorting protein 15
VPS 34	Vacuolar sorting protein 34
WT	Wild type
XBP-1	X box binding protein-1

5. INTRODUCCIÓN

5.1 Autofagia

La autofagia es un proceso fisiológico clave para la supervivencia celular frente al estrés provocado por la privación de nutrientes como aminoácidos y/o glucosa. Se ha descrito que la autofagia cumple un papel relevante en diversas patologías como el cáncer, la isquemia/reperfusión y las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer y Huntington. La autofagia comprende una serie de procesos que llevan a la degradación lisosomal de diversos componentes citoplasmáticos. Existen tres formas en que la autofagia puede ser clasificada: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas y macroautofagia.^{1,2} La microautofagia consiste en la degradación de material citoplasmático mediante invaginaciones de la membrana lisosomal, sin la necesidad de utilizar intermediarios vesiculares.² La autofagia mediada por chaperonas permite la degradación lisosomal de proteínas específicas que poseen la secuencia relacionada al pentapéptido KFERQ. Este pentapéptido es reconocido por un complejo de proteínas chaperonas compuesto por Hsc70 y Hsp90, entre otras. Estas chaperonas regulan la degradación de estas proteínas al interactuar con la proteína LAMP-2A en la membrana lisosomal, el cual a su vez actúa como un translocador que permite el ingreso y la degradación de la proteína blanco.^{2,3}

La macroautofagia (desde ahora en adelante llamada autofagia) es un proceso inducible ante condiciones de estrés, que permite la degradación de distintos componentes citoplasmáticos como la membrana plasmática, proteínas o incluso organelos completos por medio de su secuestro en vesículas de doble membrana denominados autofagosomas, los cuales al fusionarse con los lisosomas llevan a la degradación de su contenido, obteniéndose así compuestos básicos para la supervivencia celular.^{1,2}

La autofagia es un proceso finamente regulado por diversas proteínas como AMPK, mTOR y el complejo PI3K-III, entre otras.⁴ Existen distintos inductores de autofagia como hipoxia, daño al DNA, hormonas, citoquinas y, en especial, la privación de aminoácidos y/o glucosa. Estos estímulos conllevan a la activación de una serie de proteínas conocidas con el nombre de Atg (Autophagy), las cuales modulan el proceso autofágico al regular la inducción, nucleación de la membrana pre-autofagosomal, elongación de las vesículas, englobamiento de los compuestos a ser degradados y la fusión con los lisosomas.⁴⁻⁶

La vía mTOR es una de las principales vías de regulación de la autofagia. mTOR es una Ser/Thr kinasa que hiperfosforila constitutivamente a Atg13, impidiendo su interacción con la proteína kinasa Atg1 y de esta forma impidiendo la activación de la autofagia. En condiciones de privación de nutrientes, la relación ATP/AMP disminuye, activándose así AMPK, la cual inhibe a mTOR por fosforilación. Todo esto se traduce en una menor fosforilación de Atg13, permitiendo su activación e interacción con Atg1. La interacción de Atg13 con la kinasa Atg1 permite iniciar una cascada de señalización, reclutando a Atg17 junto con otras proteínas necesarias para la inducción de la autofagia.⁴⁻⁷ (Figura 1A)

Otra proteína de gran importancia para el desarrollo de la autofagia es Beclin-1/Atg6. Esta proteína junto con Vps15 y Vps34 forman parte del complejo proteico PI3K-III necesario para la nucleación y ensamblaje del complejo pre-autofagosomal conocido como fagoporo^{4,5} (Figura 1B).

El mecanismo de elongación y terminación del autofagosoma requiere de dos vías de conjugación similares a la ubiquitinación. En una de ellas, la proteína Atg12 se conjuga a Atg5 mediante la acción de Atg7 y Atg10, las cuales actúan como enzimas activadoras (E1) y conjugadoras (E2), respectivamente. Una vez conjugadas, Atg12 y Atg5 reclutan a Atg16, formando un complejo multimérico necesario para la formación y elongación del autofagosoma.^{8,9} La segunda vía involucra la unión de LC3/Atg8 a fosfatidiletanolamina mediante su procesamiento por Atg4 y la acción de las enzimas Atg7 y Atg3 que actuarían respectivamente como E1 y E2 en esta vía.^{9,10} Una vez

conjugado a fosfatidiletanolamina, LC3-II interactúa con la vesícula del autofagosoma, permitiéndonos seguir dinámicamente todo el proceso autofágico¹¹ (Figura 1C).

p62/SQSTM-1 es otra proteína importante al momento de analizar la activación de la autofagia. p62 une proteínas poli-ubiquitinadas al mismo tiempo que interacciona con LC3, de esta forma, secuestra agregados de proteínas poli-ubiquitinadas dentro de las vesículas autofágicas, provocando su degradación al unirse al lisosoma. Por esta razón, la degradación de p62 es considerada un buen marcador para medir autofagia.¹²

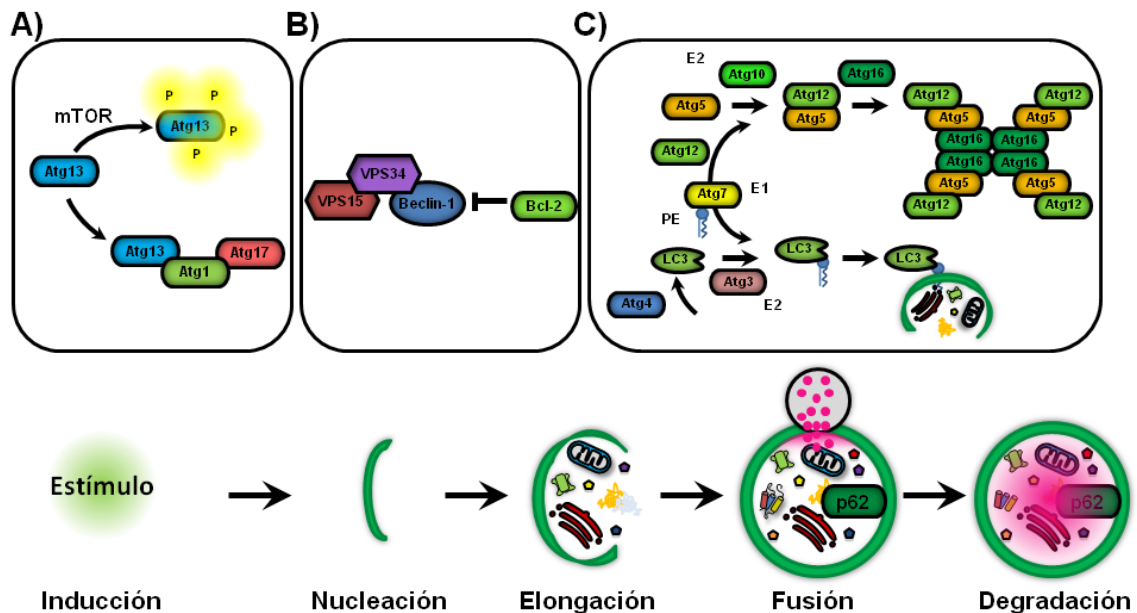


Figura 1. Etapas del flujo autofágico y sus reguladores moleculares.

A) Estímulos como la privación de nutrientes o rapamicina inhiben a mTOR, lo que lleva a la defosforilación de Atg13 y la activación de la quinas Atg1 que junto con Atg17 activan la cascada de señalización para la inducción de la autofagia. **B)** La proteína represora Bcl-2 se disocia de Beclin-1 permitiendo la activación de la PI3K-III y la nucleación de la membrana pre-autofagosomal para el reclutamiento de otras proteínas necesaria para el desarrollo de la autofagia. **C)** La elongación y terminación del autofagosoma requiere de la conjugación de varias proteínas Atg mediante un proceso similar a la ubiquitinación. La asociación de las proteínas Atg5, Atg12 y Atg16 requiere de las enzimas E1 y E2, Atg7 y Atg10, respectivamente. Por su parte, LC3 es procesado por Atg4 y unido a fosfatidiletanolamina (PE) mediante la acción de las enzimas E1 y E2, Atg7 y Atg3, respectivamente.

5.1.1 Complejo PI3K-III

Como se mencionó anteriormente, el complejo proteico PI3K-III constituye un importante regulador de la autofagia.⁴ La función general de las PI3K es fosforilar fosfatidilinositol en el grupo 3'-hidroxilo generando distintas formas fosforiladas, llamadas en su conjunto fosfoinosítidos. Los fosfoinosítidos cumplen diversas e importantes funciones celulares mediante el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas a distintos tipos de membranas dentro de la célula.^{13,14} De las tres clases de PI3K que se encuentran en mamíferos la PI3K-III es la única que exclusivamente utiliza fosfatidilinositol como sustrato generando fosfoinositol 3' fosfato (PI₃P) como producto.^{13,15} Una vez formado en la membrana, PI₃P recluta diversas proteínas involucradas en citoquinesis, endocitosis y autofagia.¹⁶⁻¹⁸ Específicamente en la autofagia, la formación de PI₃P por PI3K-III conlleva la nucleación y ensamblaje del complejo pre-autofagosomal conocido como fagoporo.^{4,5}

El complejo PI3K-III está formado por varias proteínas, de las cuales las principales son: Vacuolar sorting protein 34 (VPS34), subunidad catalítica del complejo; Vacuolar sorting protein 15 (VPS15), subunidad reguladora; y Beclin-1, que actúa como un modulador positivo del complejo. Si bien estas tres proteínas son necesarias para el correcto funcionamiento y compartimentalización del complejo PI3K-III, se ha visto que la regulación de Beclin-1 y su interacción con otras proteínas constituyen el principal mecanismo de regulación de la autofagia por la PI3K-III.^{19,20}

5.1.2 Beclin-1

Beclin-1 es una proteína de 60 kDa fundamental para la activación y correcto desarrollo del proceso autofágico. La modificación post-traducciona l de Beclin-1 junto con su asociación a otras proteínas da lugar a distintos complejos PI3K-III, de esta forma regulando la autofagia. Dentro de las proteínas capaces de asociarse a Beclin-1 se encuentran UV-radiation resistance associated gene (UVRAG), Activating molecule in Beclin-1 regulated autophagy (AMBRA1), ATG14L/Barkor y B-cell lymphoma 2 (Bcl-2).^{21,22} Si bien tanto la interacción de Beclin-1 con UVRAG como ATG14L activan la autofagia, se ha visto que su asociación es mutuamente exclusiva, por lo que cabe la posibilidad de que el complejo Beclin-1-UVRAG y Beclin-1-ATG14L regulen distintas etapas del proceso autofágico.^{13,20,21,23} Cabe destacar que si bien la unión de UVRAG a Beclin-1 promueve la autofagia, UVRAG a su vez puede interactuar con la proteína RUN domain Beclin-1 interacting and cystein-rich containing protein (RUBICON), la cual una vez asociada al complejo inhibe la autofagia al impedir la maduración de los autofagosomas.²⁴ Por su parte, AMBRA1 solo se asocia al complejo PI3K-III que posee ATG14L, actuando como un modulador positivo de la autofagia.²² Bcl-2/Bcl-XL es hasta la fecha la única proteína que inhibe la autofagia al asociarse directamente a Beclin-1.^{25,26} Se ha propuesto que la interacción de Bcl-2 con Beclin-1 impide su interacción con VPS34, de esta forma impidiendo la formación del complejo PI3K-III.²⁷

La disociación de Beclin-1 y Bcl-2 es indispensable para la activación del complejo PI3K-III e inducción de la autofagia.^{20,25,28} Por este motivo ambas proteínas están sometidas a distintas modificaciones post-traduccionales que regulan su interacción.²⁰

Se ha descrito que la fosforilación de Bcl-2 en los residuos Thr69, Ser70 y Ser87 por c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) permite su disociación de Beclin-1 y la consiguiente activación de la autofagia.²⁹ Por el contrario, la mono-ubiquitinación de Bcl-2 por la E3 ubiquitin ligasa Parkina estabiliza la unión de Bcl-2 con Beclin-1, aumenta la vida media de Bcl-2 y disminuye la activación de la autofagia, sugiriendo que la mono-ubiquitinación de Bcl-2 inhibiría la autofagia al aumentar la cantidad de Bcl-2 disponible para unirse a Beclin-1.³⁰

Con respecto a Beclin-1, esta proteína puede ser fosforilada en Thr119 por DAPK, logrando así su disociación de Bcl-2 y la inducción de la autofagia.^{20,31} Por otra parte, la E3 ubiquitin ligasa TRAF6 también promueve la disociación de ambas proteínas al poli-ubiquitinar Beclin-1 por Lys63.^{32,33} Recientemente, se describió que la E3 ubiquitin ligasa NEDD4 poli-ubiquitina por Lys11 a Beclin-1, activando así su degradación proteosomal³⁴ (Figura 2).

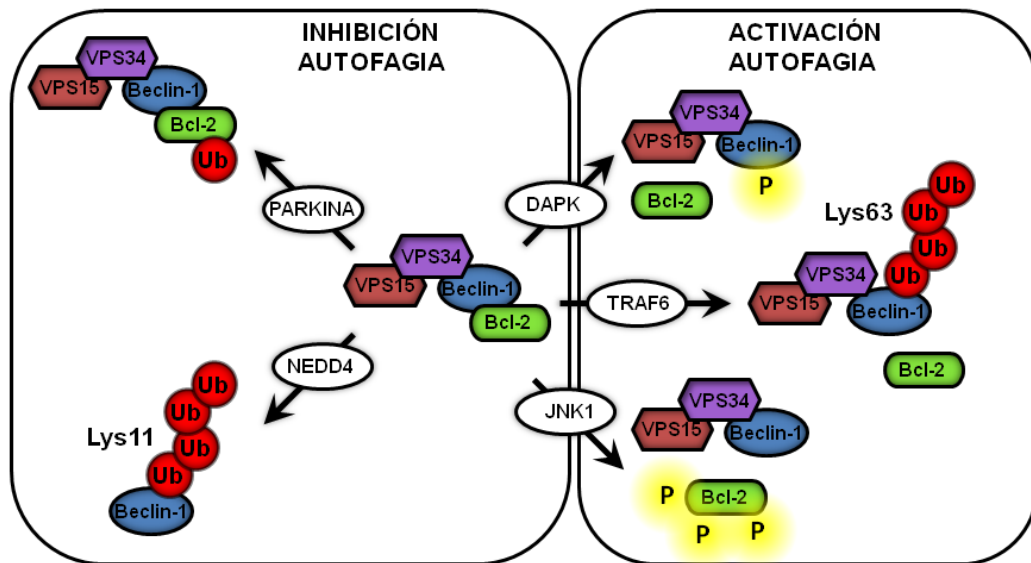


Figura 2. Regulación de la autofagia mediante la modificación postraduccional de Bcl-2 y Beclin-1.

Bcl-2 se asocia a Beclin-1 y modula negativamente la PI3K-III y la activación de la autofagia. La función inhibitoria de Bcl-2 puede ser interrumpida mediante la fosforilación de Beclin-1 por DAPK o la fosforilación de Bcl-2 por JNK1 de esta manera activando la autofagia. La poli-ubiquitinación por Lys63 de Beclin-1 mediada por E3 ubiquitin ligasa TRAF6 también disocia a Bcl-2 de Beclin-1 y activa la autofagia. La función inhibitoria de Bcl-2 se ve realizada al ser mono-ubiquitinado por la E3 ubiquitin ligasa Parkina. La E3 ubiquitin ligasa NEDD4 poli-ubiquitina por Lys11 a Beclin-1 activando su degradación proteosomal.

Además de lo mencionado anteriormente, otros estudios han señalado la importancia de la poli-ubiquitinación y degradación de Beclin-1 en la regulación de la autofagia. Spautina-1, un potente y específico inhibidor de la autofagia, funciona mediante la inhibición de la actividad peptidasa de las enzimas desubiquitinantes UPS10 y UPS13 que interaccionan y actúan sobre Beclin-1. De esta forma, el tratamiento con Spautina-1 aumenta la cantidad de Beclin-1 poli-ubiquitinado y degradado en el proteosoma, con la consiguiente desestabilización del complejo PI3K-III y la inhibición de la autofagia.³⁵ La chaperona Hsp90 también se encuentra involucrada en la poli-ubiquitinación y degradación de Beclin-1. Hsp90 se une a distintas proteínas aumentando su estabilidad y evitando su degradación. La inhibición de Hsp90 con Geldanamicina induce la poli-ubiquitinación de Beclin-1 y su consiguiente degradación proteosomal, sugiriendo que Hsp90 se une y estabiliza a Beclin-1 al evitar su poli-ubiquitinación.³⁶ Más aun, la inhibición del proteosoma utilizando lactacistina o MG132 activa la autofagia, aumentando significativamente los niveles de Beclin-1 tanto a nivel proteico como de mRNA.³⁷ Este conjunto de evidencias sugieren que la degradación de Beclin-1 constituye una importante vía para la modulación de la PI3K-III y la activación de la autofagia.

5.2 Retículo endoplásmico

Otra vía inductora de la autofagia es el estrés de retículo endoplásmico (RE).³⁸⁻⁴¹ El RE es un organelo membranoso encontrado en todas las células eucarióticas. Entre sus principales funciones podemos mencionar: La síntesis de proteínas de membrana y proteínas destinadas a ser secretadas; el correcto plegamiento de las proteínas nacientes de forma que alcancen su conformación nativa; la síntesis de lípidos y esteroides; ser uno de los principales reservorios de Ca²⁺ intracelular; y la modificación post-traduccional de proteínas como N-glicosilación y formación de enlaces disulfuro.⁴²⁻
⁴⁴ La perturbación de cualquiera de estas funciones producto de alguna patología o condición fisiológica, resulta en la generación de estrés de RE y la acumulación de agregados proteicos en el lumen del RE.⁴²⁻⁴⁷

5.2.1 Estrés de retículo y la respuesta UPR

El estrés de RE y la acumulación de agregados proteicos puede ser tóxico para la célula, por lo que su inducción conlleva la activación de una serie de vías transduccionales conocidas como la respuesta a proteínas mal plegadas o respuesta UPR (Unfolded Protein Response), cuya principal función es restablecer el normal funcionamiento del RE.⁴²⁻⁴⁶ La UPR utiliza varios mecanismos para recuperar la homeostasis del RE: atenúa la traducción general de proteínas, aumenta la transcripción de proteínas chaperonas que ayudan al plegamiento de proteínas en el RE, aumenta el volumen del RE de forma de disminuir la concentración de agregados proteicos y activa vías de degradación como el ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation) y la autofagia para eliminar proteínas terminalmente mal plegadas.⁴²⁻⁴⁶

La UPR utiliza principalmente 3 proteínas transmembrana para sensor y transducir la señal de estrés: Inositol requiring protein 1 alpha (IRE1 α), Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase (PERK) y Activating Transcription Factor 6 (ATF6).^{42,43,45,48} Estas proteínas inician vías de transducción hacia el citoplasma que culminan en la activación de factores transcripcionales como: X-Box Binding Protein 1 spliced (XBP1s),^{49,50} Activating Transcription Factor 4 (ATF4)⁵¹ y p50ATF6.⁵² Estos factores son capaces de unirse a secuencias específicas en el DNA, como UPRE (UPR Element), ERSE y ERSE II (Endoplasmic Reticulum Stress Element) encontrados en los promotores de los genes involucrados en la UPR y activar así la respuesta al estrés.^{49,50,53,54}

5.2.2 ERAD

Como se mencionó anteriormente una de las vías activadas por la UPR para contrarrestar el estrés de RE es el ERAD. Su principal función es eliminar proteínas mal plegadas del lumen del RE que podrían generar agregados tóxicos para la célula. Las proteínas que no alcanzan su conformación nativa son retro-translocadas hacia el citoplasma, poli-ubiquitinadas por E3 ubiquitin ligasas específicas y degradadas mediante el proteosoma.^{42,44,55,56}

Aunque el proceso por el cual las proteínas mal plegadas son transportadas hacia el citoplasma aún no está totalmente definido, se han descrito una serie de proteínas cuya función sería indispensable para la generación de un canal a través de la membrana del RE que permita la retro-translocación de las proteínas mal plegadas. El complejo proteico Sec61 ha sido propuesto como un posible canal para la retro-translocación de proteínas.⁵⁷ Si bien en un comienzo, este complejo se describió como un canal por el cual péptidos podían ser importados hacia el RE,^{58,59} otros estudios sugieren que también estaría involucrado en la retro-translocación y degradación proteosomal de proteínas.^{56,57,60}

La proteína Derlin-1 constituye otro posible candidato para la formación del canal. La capacidad de Derlin-1 para formar oligómeros a través de la membrana del RE a llevado a la idea de que Derlin-1 junto con otras proteínas adaptadoras, podría funcionar como un canal para la retro-translocación durante el ERAD.⁶¹ Dentro de las proteínas con las que Derlin-1 interacciona encontramos el complejo AAATPasa p97, Herp y la E3 ubiquitin ligasa Hrd1/Synoviolina encargada de poli-ubiquitinar los sustratos para su posterior degradación. Estas proteínas formarían parte del complejo retrotranslocón que permitiría el traspaso de las proteínas desde el RE al citoplasma para su degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma.^{55,56,60,62} (Figura 3)

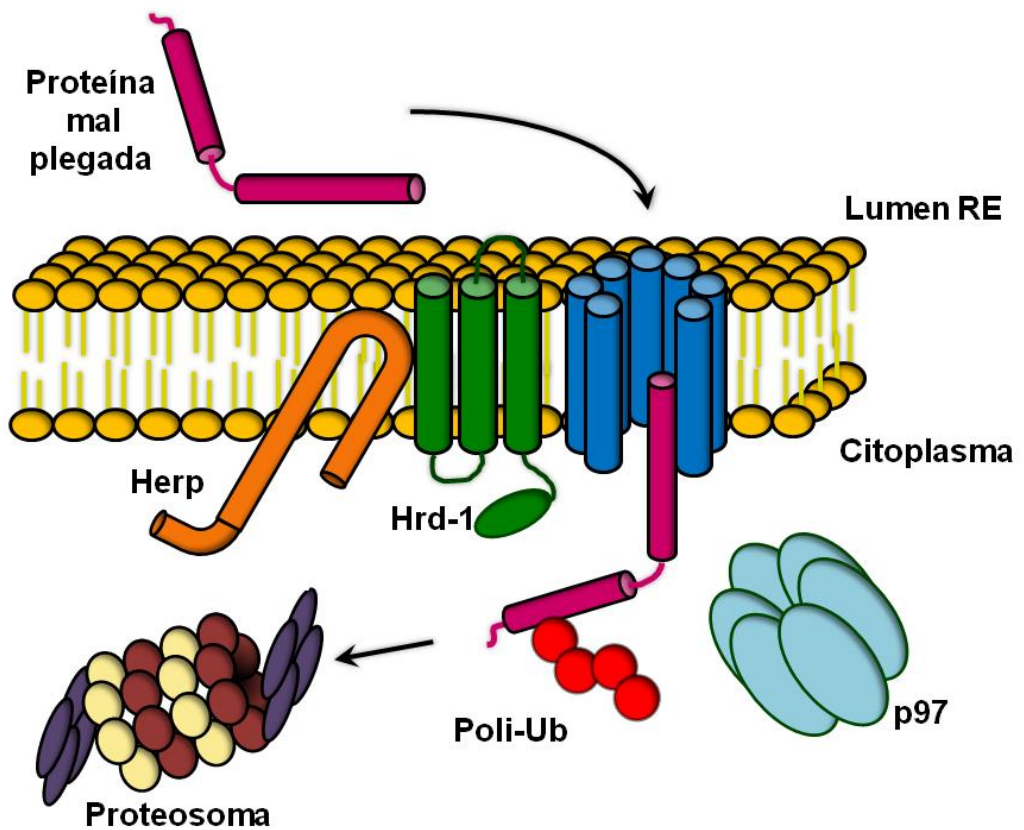


Figura 3. Vía de degradación ERAD.

Las proteínas aberrantes en el lumen del RE son reconocidas por varios mecanismos de control de calidad. Las proteínas terminalmente mal plegadas son reconocidas por un complejo proteico denominado el retrotranslocón que las exporta hacia el citoplasma. El retrotranslocón está compuesto por varias proteínas entre ellas un canal putativo en la membrana del RE que facilita la exportación de las proteínas mal plegadas. La E3 ubiquitin ligasa Hrd-1 y Herp también serían parte del retrotranslocón y estarían encargadas de la poli-ubiquitinación de las proteínas que están siendo translocadas. El complejo p97 proporciona la fuerza motora para el traspaso de las proteínas hacia el citoplasma. Finalmente las proteínas que han sido poli-ubiquitinadas son degradadas en el citoplasma por el proteosoma.

5.2.3 Sistema Ubiquitina-Proteosoma

El sistema ubiquitina-proteosoma es un proceso de degradación en el cual proteínas que han sido marcadas a través de poli-ubiquitinación son degradadas por un complejo proteico denominado proteosoma 26S.

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona en la que una pequeña proteína de 8,5 kDa denominada ubiquitina es unida covalentemente a una proteína.⁶³ La ubiquitinación es un proceso secuencial y reversible que requiere de varias enzimas clasificadas en E1 activadoras, E2 conjugadoras y E3 ligasas. Las enzimas E1 activan la ubiquitina utilizando una molécula de ATP, dando como resultado un enlace tioester entre el grupo carboxilo terminal de la ubiquitina y un residuo de Cys en la enzima E1 activadora. La segunda etapa en el proceso de ubiquitinación requiere la transferencia de la ubiquitina desde la enzima E1 hacia la E2, para esto la ubiquitina ya activada es unida a la enzima conjugadora E2 formando un nuevo enlace tioester entre ellas. Finalmente la ubiquitina es unida covalentemente a un residuo de Lys de una proteína específica mediante la acción de una E3 ubiquitin ligasa.⁶³⁻⁶⁵ Cabe mencionar que a diferencia de las enzimas E1 y E2, existe un gran número de enzimas E3 ubiquitin ligasas. Esto último se explica debido a la amplia diversidad de sustratos que son blanco de ubiquitinación, de esta manera, una mayor cantidad de enzimas E3 ligasas genera una mayor especificidad de sustrato y un mayor control global del proceso de ubiquitinación.⁶⁴ (Figura 4)

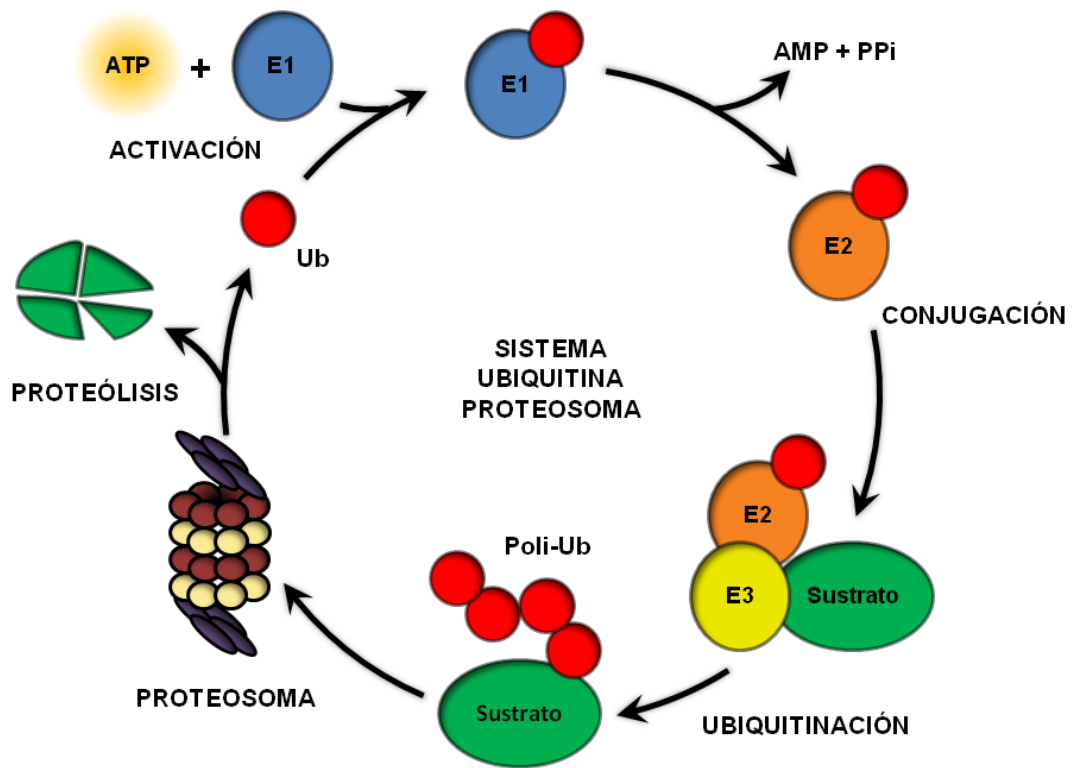


Figura 4. Sistema Ubiquitina Proteosoma.

El sistema ubiquitina proteosoma marca proteínas mediante poli-ubiquitinación para su degradación en el proteosoma. La poli-ubiquitinación requiere de 3 enzimas específicas que actúan en las distintas etapas del proceso de ubiquitinación. Las enzimas E1 activa una subunidad de ubiquitina utilizando ATP en el proceso. Las enzimas E2 se encargan de conjugar la subunidad de ubiquitina ya activada a su enzima E3 ubiquitin ligasa específica. La unión de ubiquitina a su sustrato específico es llevada a cabo por la enzima E3 ligasa. Este proceso secuencial puede repetirse varias veces generando cadenas de ubiquitina unidas por residuos de Lys específicos. La cadena de ubiquitina (Poli-Ub) es reconocida por el proteosoma el cual mediante sus distintas actividades proteolíticas degrada el sustrato y libera las subunidades de ubiquitina para que sean recicladas.

Este proceso secuencial puede repetirse varias veces permitiendo la unión de varias subunidades de ubiquitina entre sí a través de sus residuos de Lys. La unión en cadena de varias subunidades de ubiquitina a una proteína es conocida como poli-ubiquitinación.⁶³⁻⁶⁶

Cada subunidad de ubiquitina tiene un total de siete residuos de Lys, y cada uno de ellos puede ser un punto de polimerización para la formación de una cadena de ubiquitina.^{63,67,68} La más estudiada de todas ellas es la poli-ubiquitinación por Lys48, la cual se encuentra generalmente relacionada con la degradación proteosomal de la proteína marcada. Se ha visto que se necesita un mínimo de cuatro subunidades de ubiquitina unidas por su Lys48 para ser reconocidas por el proteosoma para su degradación.^{63,69} Sin embargo, otros tipos de cadenas de poli-ubiquitina unidas por Lys11 o Lys29 también serían capaces de ser reconocidas como señal de degradación.^{67,68} Por otro lado, la poli-ubiquitinación por Lys63 se encuentra relacionada principalmente con funciones no proteolíticas, tales como señalización celular, reparación del DNA y tráfico intracelular, entre otros.^{65,66,70}

El proteosoma 26S es un complejo multiproteico cilíndrico compuesto por una unidad central con un coeficiente de sedimentación de 20S que se encuentra flanqueado por dos unidades regulatorias de 19S.^{63,71} Si bien, la unidad central de 20S posee la actividad proteolítica del complejo, las unidades regulatorias a sus extremos son necesarias para el reconocimiento del sustrato a degradar, su desplegamiento y la translocación hacia la unidad central.^{72,73} Una vez que la unidad 19S reconoce el sustrato a ser degradado, la subunidad Rpn11/Poh1 escinde la cadena de poli-ubiquitina, permitiendo que las subunidades de ubiquitina que formaban la cadena puedan ser recicladas.^{73,74} Cuando el sustrato finalmente es translocado, dentro de la unidad central, es degradado mediante distintas actividades proteolíticas. Se ha visto que el proteosoma utiliza actividad hidrolasa similar a caspasas, similar a tripsina y similar a quimotripsina, permitiendo cortar enlaces peptídicos en el carboxilo terminal de residuos aminoácidos ácidos, básicos e hidrofóbicos, respectivamente.⁷²

5.2.4 Herp

Homocysteine-induced Endoplasmic Reticulum Protein (Herp) es una proteína integral de membrana asociada al RE que aumenta rápida y significativamente sus niveles al generarse estrés de RE y activarse la vía UPR.^{75,76} Herp tiene una vida media corta de alrededor de 4 h, siendo rápidamente degradado mediante el sistema ubiquitina-proteosoma.^{77,78} La expresión de Herp está regulada por las secuencias ERSE y ERSE-II ubicadas en su región promotora. Estas secuencias son activadas por los factores transcripcionales p50ATF6 y XBP1s generados durante la UPR.⁷⁹ Se ha visto que las tres ramas de la UPR (IRE1 α , PERK y ATF6) participarían en la expresión de Herp, otorgándole a esta proteína un papel central en la respuesta al estrés de RE.⁸⁰

A pesar de que Herp responde a diversos estímulos inductores de estrés de RE como mercaptoetanol, tunicamicina y taspigargina, entre otros,⁷⁵ hasta la fecha se conoce muy poco acerca de su función en la respuesta al estrés. Algunos autores han descrito que Herp cumple funciones citoprotectoras frente al estrés de RE en modelos neuronales al prevenir la apoptosis principalmente mediante la regulación de la salida de Ca²⁺ del RE y la disminución de la activación de las caspasas.^{77,81,82}

Estudios topológicos de Herp demostraron que esta proteína atraviesa el RE por medio de dos dominios transmembrana, mientras que sus dominios tanto amino como carboxilo terminal se encuentran orientados hacia el citoplasma.^{75,83} El análisis de la secuencia de Herp logró determinar que su región amino terminal contiene un inusual dominio análogo a ubiquitina o ULD (Ubiquitin-Like Domain), lo cual abrió la posibilidad de que Herp estuviera vinculado con la vía de degradación ERAD.^{75,76}

Posteriormente se mostró que Herp forma parte del retrotranslocón encargado de la exportación de proteínas mal plegadas desde el lumen del RE hacia el citoplasma para su poli-ubiquitinación y degradación proteosomal.⁸⁴ Herp forma parte de este complejo junto con p97, Derlin-1 e interacciona directamente con la E3 ubiquitin ligasa Hrd-1.^{84,85} Más aun, Herp, en específico su dominio ULD, regularía la actividad ubiquitin ligasa de Hrd-1 permitiendo así la degradación de sustratos específicos como la proteína mutante α 1-antitripsina.⁸⁵ Cabe mencionar que Herp también regula la poli-ubiquitinación y degradación proteosomal de Hrd-1.⁸⁶

Esto último se pudo apreciar en ratones knock-out (KO) de Herp que presentaban un importante aumento en los niveles de Hrd-1 en varios tejidos, especialmente en pancreas.⁸⁷ Otros estudios han señalado que Herp interactúa con otras E3 ubiquitin ligasas como SIAH1a y POSH.^{88,89} La interacción de Herp con SIAH1a regularía la degradación de sustratos específicos de esta E3 ubiquitin ligasa como synphilina-1 y α -synucleína.⁸⁹ Mientras que la unión de Herp a POSH estaría involucrada en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} reticular.⁸⁸

Por otra parte, se ha mostrado que Herp y su dominio ULD están involucrados en la degradación de varias proteínas que serían sustratos de la vía de degradación del ERAD. Así, células HeLa tratadas con un siRNA para Herp mostraron una significativa estabilización de la proteína CD3 δ , sugiriendo la importancia de Herp en su degradación.^{84,90} Por otro lado, Herp mostró ser relevante en la degradación proteosomal de conexina 43, un conocido sustrato del ERAD.⁷⁷ Tanto Herp como Hrd-1 son requeridos para la poli-ubiquitinación y degradación proteosomal de una forma no secretable de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina.⁹¹ Además, Herp promueve y es necesario para la degradación de la proteína policistina-2 mediante la vía ERAD.⁹² Herp y su dominio ULD también mostraron ser importantes para la ubiquitinación y degradación de nicastrina.⁹³ Finalmente, ratones Herp KO presentaron un ERAD defectuoso en varios tejidos especialmente en hígado, mostrando dificultades para degradar la proteína α 1-antitripsina.⁸⁷ Todas estas evidencias apuntan a que Herp tendría una función clave en la degradación de proteínas, comunicando la vía de degradación del ERAD y el sistema ubiquitina-proteosoma (Figura 5A).

Recientemente nuestro Laboratorio mostró que una disminución de Herp en líneas celulares HeLa y MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) promueve una menor acumulación de agregados de proteínas poli-ubiquitinadas, y que esta disminución estaría relacionada con un aumento en la autofagia inducida luego del estrés nutricional provocado por la privación de glucosa (Dra. Clara Quiroga, Tesis Doctorado en Bioquímica, Universidad de Chile). Estos hallazgos llevaron a concluir que Herp actúa como un modulador negativo de la autofagia (Figura 5B). Estudios posteriores demostraron que en ausencia de Herp, los niveles de Beclin-1 aumentan significativamente, lo que sugiere que Herp podría inhibir la autofagia al inducir la poli-ubiquitinación por lys48 de Beclin-1 y su subsiguiente degradación en el proteosoma.

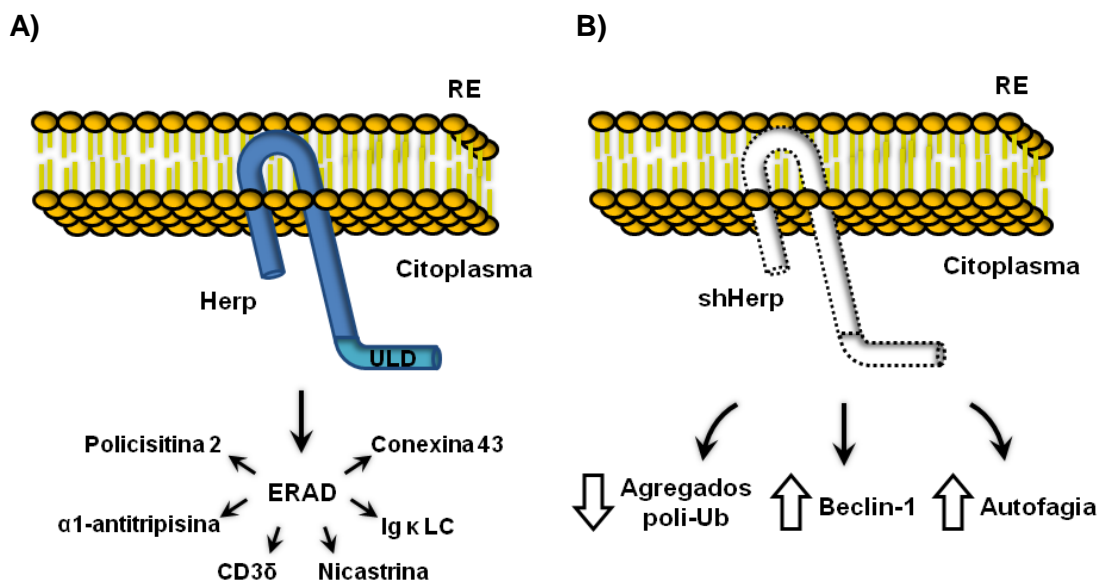


Figura 5. Herp participa en la regulación del ERAD y de la autofagia.

Herp es una proteína transmembrana del RE con un dominio similar a ubiquitina (ULD) en su región amino terminal que mira hacia el citoplasma. **A)** Herp y su dominio ULD están involucrados en la degradación de varias proteínas que son sustratos de la vía de degradación ERAD como: Policistina 2, Conexina 43, α1-antitripsina, la cadena liviana de la inmunoglobulina κ (Ig κ LC), CD3δ y Nicastrina. **B)** Recientemente nuestro laboratorio descubrió que en ausencia de Herp (shHerp) las células presentaban una mayor cantidad de Beclin-1 y que al ser privadas de glucosa estas células mostraban un aumento en la autofagia y una disminución de agregados poli-ubiquitinados (poli-Ub).

6. HIPÓTESIS

“Herp induce la poli-ubiquitinación y degradación de Beclin-1 mediante la activación de Hrd-1 en células HeLa”.

7. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que Herp activa la E3 ubiquitin ligasa Hrd-1 y de esta manera induce la poli-ubiquitinación y degradación proteosomal de Beclin-1 en células HeLa.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1

Investigar si Beclin-1 se encuentra poli-ubiquitinado en condiciones basales y privadas de glucosa (activación de la autofagia); y si esta poli-ubiquitinación depende de Herp.

Objetivo específico 2

Determinar si la poli-ubiquitinación de Beclin-1 en lisina 48 está vinculada con su degradación vía proteosomal.

Objetivo específico 3

Estudiar si Herp induce la poli-ubiquitinación de Beclin-1 al activar la ubiquitin ligasa Hrd-1.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Reactivos generales

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), tritón X-100, EDTA, los siRNA de Herp y Hrd-1; y los anticuerpos anti- β -tubulina y anti-Flag. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón y conejo, además del MG132 se obtuvieron de Calbiochem (La Jolla, CA, USA). El suero fetal bovino (FBS) se adquirió de Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Gibco-BRL (Paisley, Scotland, UK) proveyó la L-glutamina (100X), aminoácidos no esenciales (100x), Hepes (1M), tripsina 1x-EDTA, penicilina/estreptomicina y el RPMI 1640 (RPMI). El reactivo Hoechst se adquirió de Molecular Probes-Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El inductor de estrés de retículo taspigargina y el anticuerpo anti-Herp se obtuvieron en BIOMOL International LP (Plymouth Meeting, PA, USA). Los anticuerpos secundarios anti IgG de ratón y conejo Trueblot fueron adquiridos en E-Bioscience. Todos los insumos para electroforesis SDS-PAGE, junto con las membranas de nitrocelulosa y de PVDF se adquirieron en Bio-Rad Laboratories (Hércules, CA, USA). El medio de montaje para fluorescencia DAKO se obtuvo de DAKO Corporation (CA, USA). De Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) se obtuvieron las esferas de agarosa cubiertas de proteínas A y G, proteín A/G PLUS-Agarose, el siRNA aleatorio control, además de los siguientes anticuerpos, anti-BCN1, anti-ubiquitina, anti-GAPDH. Cell Signaling (Beverly, MA, USA) proveyó los anticuerpos anti-Beclin-1, anti- LC3b, anti- Ub Lys48 y anti- Ub Lys63. Los reactivos para quimioluminiscencia Western lighting se adquirieron de Perkin Elmer Life Sciences, Inc (Boston, USA). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). Finalmente, el material plástico para cultivo celular se adquirió en FALCON.

9.2 Líneas celulares

Todas las células se mantuvieron en medio DMEM en alta glucosa suplementado con 10% de FBS, 2 mM L-glutamina, 100 μ M aminoácidos no esenciales y antibióticos (10.000 U/ml de penicilina y 10 μ g/ml de estreptomina) a 37°C y CO₂ al 5%. Las líneas celulares derivadas de HeLa se mantuvieron en medio DMEM alto en glucosa suplementado con 10% FBS y 1 mM de HEPES. Todas las líneas celulares se subcultivaron cada 2 a 5 días por tripsinización, de forma de mantener una confluencia menor o igual al 80%. Todas las líneas celulares se usaron en un margen de tiempo que no superara los 15 pasajes o ciclos de cultivo.

9.3 Inducción de la autofagia, del estrés de RE y la inhibición proteosomal

Para inducir estrés de RE, las células se trataron con 1 μ M taspigargina en medio DMEM 10% FBS. La autofagia se evaluó a las 6 h de tratamiento con un medio privado de glucosa (RPMI). Para determinar el papel del proteosoma en la degradación de Beclin-1 se utilizó el inhibidor del proteosoma MG132 a una concentración de 20 μ M.

9.4 Microscopía

La técnica de microscopía se utilizó para visualizar la redistribución de LC3 posterior a la privación de glucosa. Para ello, células Herp y Luciferasa KD U2OS LC3-GFP se sembraron a una confluencia alrededor del 30% sobre cubre-objetos de vidrio. Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄; pH 7,4) frío y se fijaron con paraformaldehído al 4% y 50 ng/ml de Hoechst en PBS durante 15 min. A continuación, las células se lavaron con PBS, se montaron en portaobjetos sobre DAKO para retardar el decaimiento de la fluorescencia y se visualizaron y capturaron en un microscopio confocal LSM Pascal 5 (Carl Zeiss). Las imágenes se procesaron mediante los softwares Huygens Professional, Image-J y Adobe Photoshop CS5.

9.5 Western blot

Una vez tratadas las células se lavaron y lisaron con tampón NP40 que incluía un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas. El extracto celular se recolectó y centrifugó a 13.300 x g por 10 min a 4°C. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay) y luego las proteínas se desnaturaron en tampón SDS-PAGE 4x. Dependiendo del ensayo, geles de poliacrilamida entre 10% y 15% se cargaron con 30 a 50 µg de proteínas totales. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro de 0,2 µ) o PVDF (Bio-Rad) y bloqueadas con leche o BSA 5% en TBS 0,05% Tween 20 (TBS-T). A continuación de la transferencia, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. Los siguientes anticuerpos se utilizaron a diferentes diluciones: anti-Herp 1:50.000, anti-LC3 1:1.000, anti-Beclin-1 1:1.000, anti-Ub-Lys48 1:1000, antiUb-Lys63 1:000, anti-Flag 1:1.000, anti-Ub 1:3.000, anti-β-tubulina 1:5.000 y anti-GAPDH 1:5.000. Una vez incubadas, las membranas se lavaron 3 veces durante 15 min en TBS-T y posteriormente se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón (según corresponda) acoplado a la enzima peroxidasa (HRP). Luego de lavar las membranas, se incubaron con las soluciones para la reacción quimioluminiscente y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas expuestas se digitalizaron y las imágenes se procesaron con ayuda de los programas computacionales Adobe Photoshop CS5 e ImageJ.

9.6 Inmunoprecipitación

Una vez concluido el estímulo, las células se lisaron con tampón NP40 que incluía un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas. El extracto celular se recolectó y centrifugó a 13.300 x g por 10 min a 4°C. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay). 400 µg de proteína se colocaron en presencia de 40 µl de proteína A/G PLUS-Agarose y 2 µg de anticuerpo manteniéndose en agitación a 4°C por toda la noche. A continuación se realizaron 3 centrifugaciones de 9.000 x g por 5 min a 4°C. Luego de cada centrifugación se eliminó el sobrenadante y la pella se lavó con 120 µl de tampón NP40 con inhibidores. Finalmente las muestras fueron disueltas en tampón de carga SDS-PAGE 4x para su desnaturalización y se continuó el correspondiente protocolo de Western blot.

9.7 Silenciamiento mediante siRNA

Para el silenciamiento de proteínas en líneas celulares el siRNA liofilizado se disolvió en agua nanopura a una concentración final de 33 µM. Una vez resuspendido, el siRNA se calentó a 90°C por 1 minuto para luego dejarse enfriar a 37°C por 20 minutos. Brevemente, para transfectar una placa de 35 mm con una concentración final de 100 nM de siRNA, 3 µL del siRNA (33 µM) se disolvió en 177 µL de Optimem, mientras que 4 µL de oligofectamina se disolvió en 20 µL de Optimem, y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente las soluciones se mezclaron, agitaron cuidadosamente e incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agregó lentamente a la placa de 35 mm a 60% de confluencia previamente lavada con PBS y mantenida a en volumen final de 1 ml de medio Optimem sin suero y sin antibióticos. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por toda la noche y a continuación se lavaron e incubaron en medio completo. Para obtener un silenciamiento satisfactorio de la proteína, las células se mantuvieron en estas condiciones durante al menos 48 h previo al ensayo.

9.8 Transfección transitoria

La transfección de líneas celulares con los diferentes plasmidios se realizó utilizando el reactivo de transfección en base a lípidos catiónicos Lipofectamina 2000 de acuerdo con las indicaciones del proveedor (Invitrogen). La transfección se realizó utilizando la razón 1:2 entre μg de DNA y μl de lipofectamina, respectivamente. Brevemente, para transfectar placas de 100 mm, alrededor de 6 μg de DNA plasmidial y 12 μl de lipofectamina se diluyeron individualmente en medio Optimem sin suero y sin antibióticos a un volumen final de 285 μl , se agitaron suavemente e incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido este periodo se mezclaron las soluciones e incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agregó lentamente a las placas de 100 mm a 60% de confluencia previamente lavadas y mantenidas a un volumen final de 4 ml de medio Optimem sin suero y sin antibióticos. Las células se incubaron en presencia de los complejos liposomas/DNA a 37°C y 5% de CO_2 por 6 h y posteriormente se lavaron y se incubaron en medio completo. Para obtener una expresión satisfactoria de los plasmidios las células se mantuvieron en estas condiciones durante al menos 24 h previo al ensayo.

9.9 Producción de lentivirus e infección lentiviral

La metodología para producir líneas celulares modificadas y estables en el tiempo se dividió en tres etapas. En primer lugar las células HEK293T se transfectaron para producir el virus. Luego el virus obtenido se recolectó para poder infectar las células y finalmente se seleccionaron aquellas células que incorporaron la modificación.

Brevemente, 24 h previas al inicio del protocolo, células HEK293T se sembraron en placas de 100 mm a 50% de confluencia con medio DMEM, 5% FBS, 10.000 U/ml de penicilina y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomina. Todos los ensayos se realizaron en células que no sobrepasaran los 6 a 10 pasajes y se transfectaron con lipofectamina 2000, según el protocolo de transfección transitoria descrito previamente. Para este fin, 0,272 μg del plasmidio VSV-G se mezcló con 1,36 μg de pMDL, 1,36 μg de REV y 2,72 μg del

plasmidio de interés a un volumen final de 285 μ l en DMEM sin suero y sin antibióticos. Por otra parte, 12 μ l de lipofectamina se diluyó en 285 μ l de DMEM sin suero y sin antibióticos. Posteriormente se mezclaron las soluciones y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente antes de agregar a las placas de 100 mm. Una vez transfectadas las células, y luego de 48 h, se recolectaron los lentivirus del medio de cultivo. Para esto, el medio de cultivo se filtró utilizando filtros de nitrocelulosa de 0,45 μ m de diámetro de poro.

Un día previo a la recolección del virus, las células HeLa y U2OS LC3-GFP se sembraron en placas de 100 mm a una confluencia de 40% en medio DMEM 5% FBS, suplementado en el caso de las células HeLa con 10 mM de Hepes. El virus, que expresa un shRNA contra Herp humano se agregó a las placas de las células para comenzar el periodo de infección. Este medio condicionado se suplementó con medio fresco a un volumen máximo por placa de 10 ml. Después de 48 h de infección, las células blanco se lavaron y se cambió el medio por uno suplementado con 2 μ g/ml de puromicina. Las células seleccionadas con la puromicina se replaquearon 48 h después del inicio del tratamiento con puromicina para congelarlas en nitrógeno líquido y conservarlas.

El propósito de esta técnica fue producir una línea celular que expresara en forma estable un siRNA contra Herp humano. La expresión de Herp en respuesta a estrés de RE se evaluó en las células obtenidas de este procedimiento. Células infectadas con un lentivirus que expresa un siRNA para luciferasa se utilizaron como controles.

Como control de infección viral se utilizó el plasmidio Phage-PGK-eGFP-IRES-eGFP, que expresa la proteína GFP, para un fácil seguimiento mediante citometría de flujo.

9.10 Expresión de los resultados y análisis estadístico

Los datos estadísticos fueron expresados como el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los símbolos * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ corresponden a significancias estadísticas respecto de su control sin estímulo. El análisis estadístico se realizó con ayuda del software GraphPad Prism 5 mediante el test de Student y el test de análisis de varianzas (ANOVA) de una o dos vías según corresponda en conjunto con el test de comparaciones múltiples de Tukey.

10. RESULTADOS

10.1 Efecto de la disminución de Herp en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1

Para determinar si la proteína Herp cumple un papel en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1, líneas celulares HeLa Knock-Down (KD) para Herp (shHerp) o Luciferasa (shLuc) como control se utilizaron en ensayos de inmunoprecipitación (IP) de Beclin-1 para luego realizar Western blot (WB) utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente cadenas de ubiquitina unidas por su Lys48 (Ub Lys48). Debido a la importancia de Beclin-1 en la activación de la autofagia, el efecto de Herp en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 también se analizó en condiciones de privación de glucosa (EN-G) durante 6 h. El tiempo de 6 h de privación se seleccionó en base a los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio.

Como se observa en la Figura 6A, las células KD de Herp mostraron una menor cantidad de Beclin-1 poli-ubiquitinado por Lys48 en comparación con las células controles. Las células privadas de glucosa por 6 h mostraron un patrón similar a las no privadas. La sobreexposición de la membrana al papel fotográfico reveló bandas de mayor masa molecular (mayor a los 80 kDa (*)). Dado que Beclin-1 pesa alrededor de 60 kDa y cada subunidad de ubiquitina 8,5 kDa, estas bandas podrían corresponder a cadenas de, por lo menos, 4 subunidades de ubiquitina unidas a Beclin-1 (Figura 6B).

Posteriormente para determinar la cantidad de Beclin-1 inmunoprecipitado se deshibridizó la membrana y se realizó un Western blot, utilizando un anticuerpo específico para Beclin-1 (Figura 6C). Los resultados indican la presencia de bandas por encima de los 80 kDa (*) (Figura 6D), al igual que lo observado con el anticuerpo para Ub Lys48.

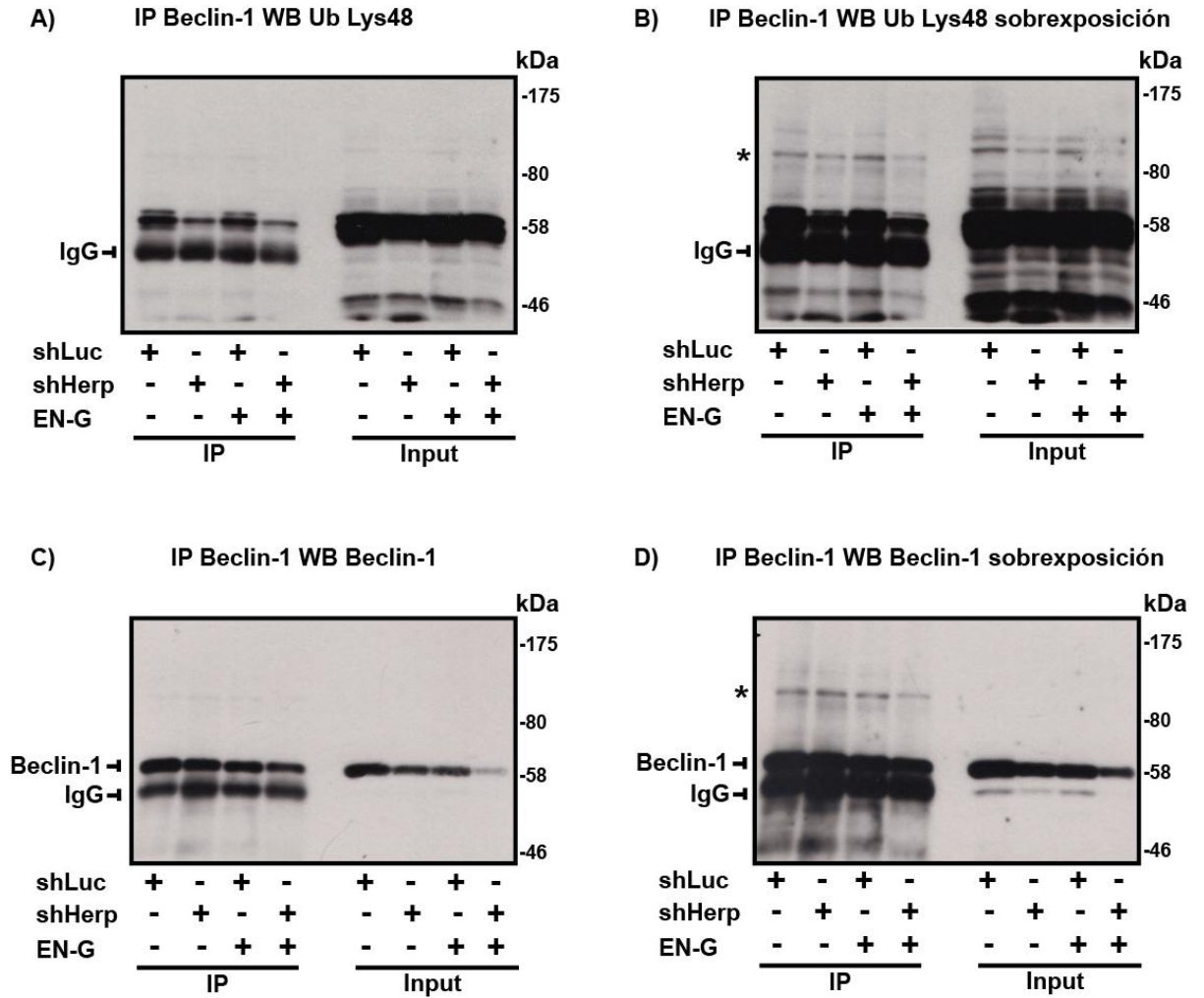


Figura 6. Herp regula la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1.

Inmunoprecipitación (IP) de Beclin-1 en células HeLa KD para Herp (shHerp) y KD control (shLuc) en presencia o ausencia de glucosa (EN-G). **A)** Western Blot (WB) para poli-ubiquitina unida por Lys48 (Ub Lys48). El input corresponde al lisado total de células. **B)** La sobreexposición del WB de Ub Lys48 permitió observar bandas por encima de los 80 kDa (*). **C)** WB para Beclin-1. **D)** La sobre exposición del Wb para Beclin-1 permitió observar bandas por encima de los 80 kDa (*).

La Figura 7 muestra la cuantificación de los resultados de la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 en células shHerp o shLuc como control en condiciones con y sin glucosa. Los niveles cuantificados en cada punto corresponden a la banda de Beclin-1 poli-ubiquitinado por Lys48 corregido por la cantidad total de Beclin-1 que fue inmunoprecipitado. La cuantificación mostró una disminución significativa de los niveles de Beclin-1 poli-ubiquitinado por Lys48 en las células KD de Herp (shHerp). También se observó una disminución significativa en las células KD de Herp privadas de glucosa por 6 h.

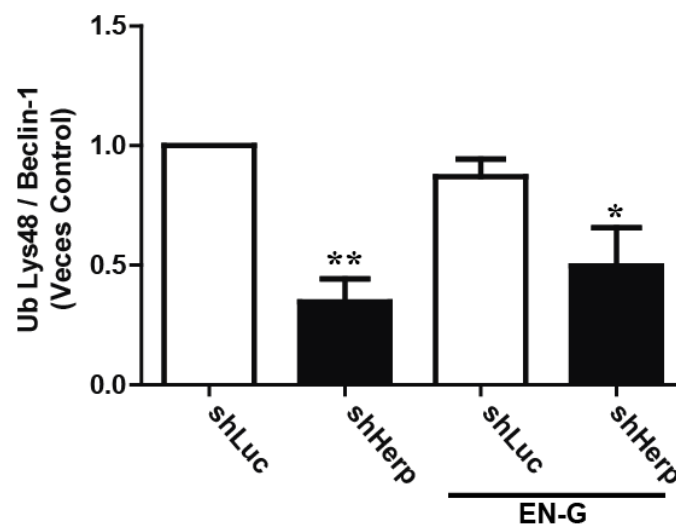


Figura 7. La poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 disminuye en ausencia de Herp.

El gráfico de barras representa la relación entre los niveles de Beclin-1 poli-ubiquitinado por Lys48 normalizados con respecto a los niveles totales de Beclin-1 inmunoprecipitado y relativizados respecto a las células KD control sin estímulo (shLuc). Los datos corresponden al promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs shLuc.

Como control se realizó una inmunoprecipitación inversa, donde se inmunoprecipitó ubiquitina para luego realizar Western blot de Beclin-1. Los resultados mostraron una marcada disminución de Beclin-1 en las células shHerp en comparación a las células controles (shLuc). Además a similitud de los resultados de la Figura 6, se observaron bandas por encima de los 80 kDa (*), atribuibles a Beclin-1 unido a, por lo menos, 4 subunidades de ubiquitina (Figura 8A). Posteriormente y como control, la membrana se deshibridizó para luego realizar Western blot de Ub Lys48. Las células shHerp mostraron una menor cantidad de ubiquitina unida por Lys48 en comparación a las células shLuc (Figura 8B).

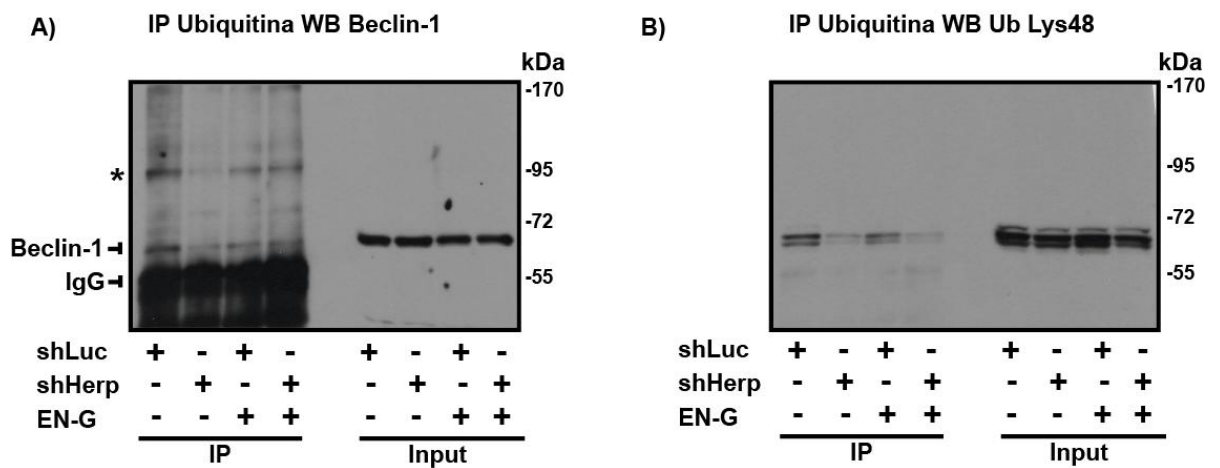


Figura 8. Inmunoprecipitación inversa: Herp regula la poli-ubiquitinación por LYS48 de Beclin-1.

Inmunoprecipitación (IP) de ubiquitina en células HeLa KD de Herp (shHerp) y KD control (shLuc) en presencia y ausencia de glucosa (EN-G). **A)** Western blot (WB) de Beclin-1. El input corresponde al lisado total de células. Se observaron bandas por encima de los 80 kDa (*). **B)** Western blot (WB) de poli-ubiquitina unida por Lys48 (Ub Lys48).

Para corroborar los resultados obtenidos en las células KD de Herp, células HeLa WT se transfectaron con un siRNA específico para Herp de forma de silenciar los niveles de esta proteína, como control se utilizó un siRNA aleatorio.

La Figura 9 muestra la estandarización de los dos siRNA de Herp (100 y 150 nM) utilizados en esta tesis.

Herp tiene una vida media corta de 4 h y es rápidamente degradado, por lo que en condiciones normales generalmente existen bajos niveles de Herp dentro de la célula.^{77,78} Por este motivo se utilizó Tapsigargina (Thap), un conocido estresor de RE para estimular la expresión de Herp. Thap inhibe la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP denominada SERCA, evitando que el RE restablezca sus concentraciones de Ca^{2+} normales, lo que lleva al mal funcionamiento de múltiples proteínas chaperonas,⁹⁴ la generación de estrés de RE y la activación de la vía UPR de la cual Herp es dependiente.⁸⁰

Los niveles de Herp aumentaron en células tratadas con el siRNA control en presencia de Thaps (1 μM) en tanto las células tratadas con el siRNA de Herp no presentaron dicho incremento a ninguna de las dos concentraciones del siRNA, 100 y 150 nM.

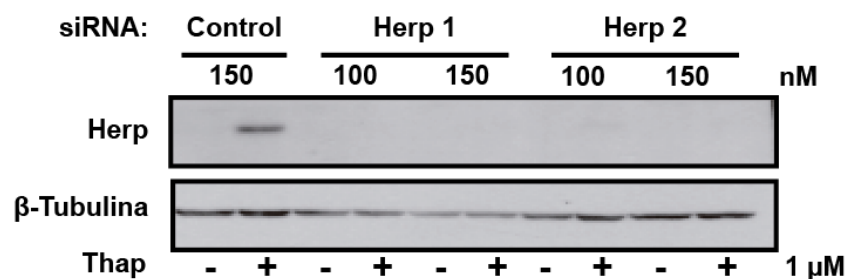


Figura 9. Estandarización de los siRNA de Herp.

Células HeLa WT se transfectaron con uno de los dos siRNA de Herp a concentración final de 100 y 150 nM; o siRNA control 150 nM. En la parte superior se observa un Wb para Herp y en la inferior para β-tubulina. Tapsigargina (Thap) 1 μM se utilizó para inducir estrés de RE.

Una vez estandarizado el uso de los siRNA de Herp, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de Beclin-1 y ubiquitina, respectivamente. La Figura 10A muestra la inmunoprecipitación de Beclin-1 y Western blot contra Ub Lys48, donde se pudo observar una marcada disminución de Beclin-1 poli-ubiquitinado por Lys48 en las células transfectadas con el siRNA de Herp. La cantidad total de Beclin-1 inmunoprecipitado se comprobó mediante la deshibridación de la membrana y Western blot contra Beclin-1 (Figura 10B).

Al realizar la inmunoprecipitación de ubiquitina y Western blot para Beclin-1 se observó una disminución de Beclin-1 poli-ubiquitinado (Figura 10C). Finalmente y como control se deshibridizó la membrana y se realizó un Western blot utilizando el anticuerpo Ub Lys48, observándose una disminución en la cantidad de proteínas poli-ubiquitinadas por Lys48 en las células transfectadas con el siRNA de Herp (Figura 10D).

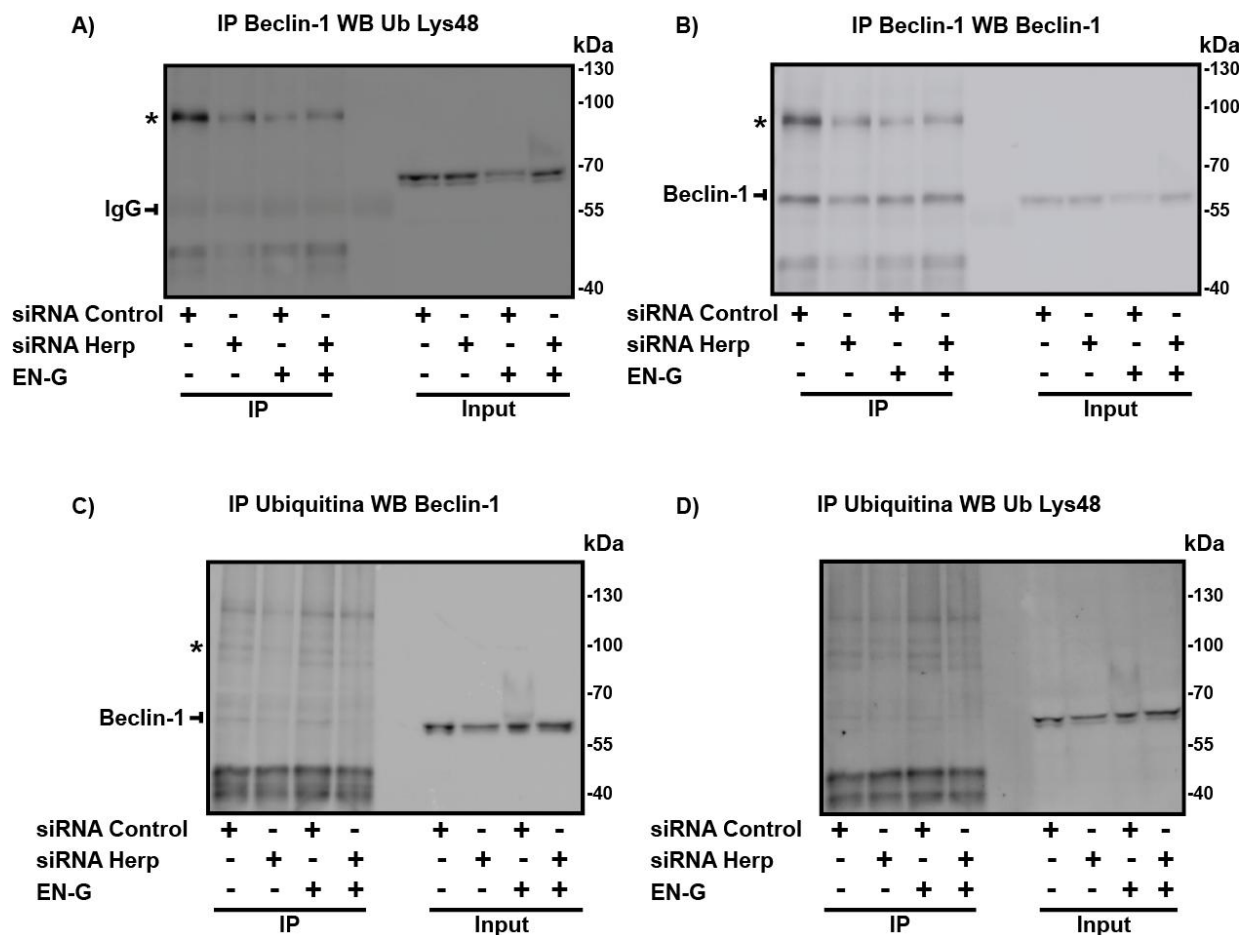


Figura 10. La disminución de Herp producto de la transfección con siRNA específicos disminuye la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1.

Inmunoprecipitación (IP) de Beclin-1 o ubiquitina en células HeLa WT transfectadas con siRNA de Herp o siRNA control en presencia y ausencia de glucosa (EN-G). **A)** Inmunoprecipitación de Beclin-1 y Western Blot (WB) de poli-ubiquitina unida por Lys48 (Ub Lys48). Se observaron bandas por encima de los 80 kDa (*). El input corresponde al lisado total de células. **B)** Western blot de Beclin-1. Nuevamente se observaron bandas por encima de los 80 kDa (*). **C)** Inmunoprecipitación ubiquitina y Western blot de Beclin-1. Bandas por sobre los 80 kDa (*) se observaron en los western blot. **D)** Western blot de Ub Lys48.

Finalmente, se determinó el efecto de Herp en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 exógeno. Para este fin, células HeLa shHerp y shLuc como control se transfectaron con el plasmidio Beclin-1-Flag, que permite sobre-expresar Beclin-1 unido a un epítotope Flag en su extremo carboxilo terminal. A continuación se inmunoprecipitó Flag y se realizó un Western blot contra Ub Lys48.

Como se observa en la Figura 11A las células KD de Herp (shHerp) mostraron una importante disminución en Beclin-1 exógeno poli-ubiquitinado por Lys48. Una vez más, pudimos observar bandas mayores a los 80 kDa que corresponderían a Beclin-1 unido a una cadena de 4 ubiquitinas (*). Posteriormente y como control de IP se realizó un Wb contra el epítotope Flag. (Figura 11B).

En conjunto estos resultados sugieren que una disminución de Herp conlleva a una disminución de la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1. Por lo tanto, Herp jugaría un papel importante en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1. Por otro lado, la privación de glucosa durante 6 h no presentó diferencias con respecto a las muestras no privadas de glucosa en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1. Por lo que la activación de la autofagia por privación de glucosa no estaría relacionada con la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1.

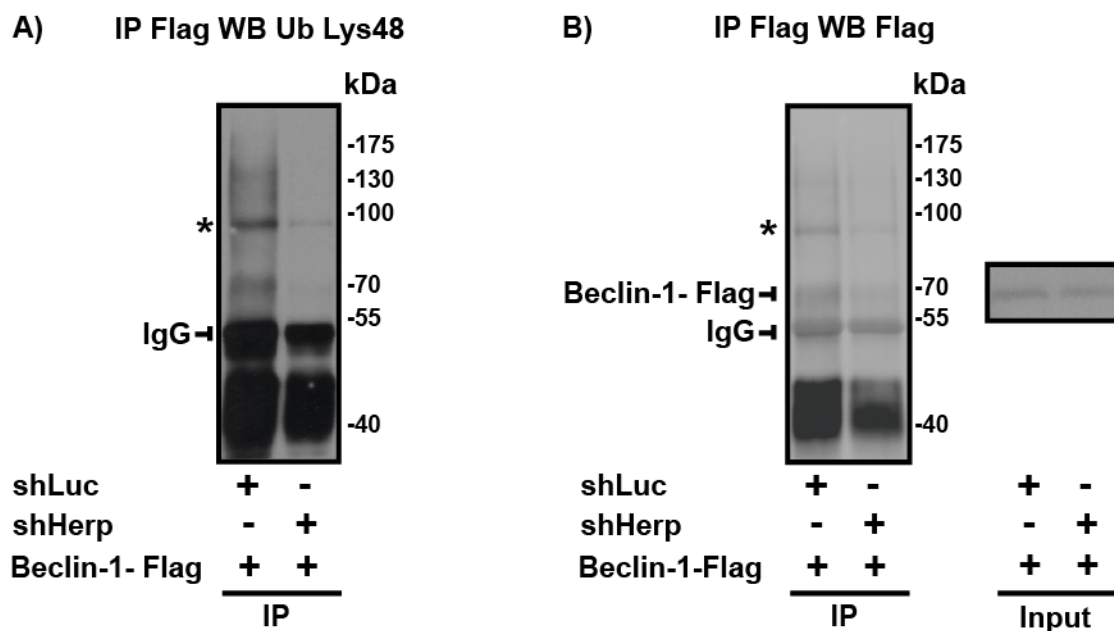


Figura 11. Herp regula la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 exógeno.

Células HeLa KD de Herp (shHerp) y KD control (shLuc) se transfectaron con el plasmidio Beclin-1-Flag y posteriormente se realizó IP del Flag. **A)** Western Blot (WB) para poli-ubiquitina unida por Lys48 (Ub Lys48). El * indica las bandas mayores a 80 kDa de Ub Lys48. **B)** Western blot correspondiente al Flag. El * indica las bandas mayores a 80 kDa observadas para el Flag. El input corresponde al lisado total de células.

10.2 Relación entre el aumento de Beclin-1 en las células KD de Herp y su degradación proteosomal

Para determinar si el aumento de Beclin-1 en las células que tienen disminuido Herp tiene relación con una disminución de la degradación proteosomal de esta proteína, las células HeLa KD de Herp (shHerp) y Luc (shLuc) como control se trataron con el inhibidor proteosomal MG132 a una concentración final de 20 μ M por un periodo de 6 h. A continuación las muestras fueron analizadas por Western blot de Beclin-1. Los niveles de ubiquitina se determinaron por Western blot como control de la inhibición del proteosoma por el inhibidor MG132 (Figura 12A).

La Figura 12B muestra el análisis de los resultados, donde se observa que las células KD de Herp (shHerp) presentan un aumento significativo en los niveles de Beclin-1 en comparación a las células KD controles (shLuc), como ya había sido reportado previamente por nuestro laboratorio. El tratamiento con MG132 aumentó significativamente la cantidad de Beclin-1 en las células shLuc. Sin embargo, las células shHerp tratadas con MG132 no presentaron diferencias significativas con respecto a las shHerp no tratadas.

Para corroborar estos resultados, el mismo experimento se realizó en células HeLa WT transfectadas con los siRNA de Herp o un siRNA aleatorio como control (Figura 12C).

Al analizar los resultados se observó que ambos siRNA de Herp utilizados mostraron una tendencia al aumento de Beclin-1, como se mostró previamente en las células shHerp. Por otra parte, mientras las células tratadas con el interferente para Herp y MG132 también mostraron una tendencia al aumento de los niveles de Beclin-1, las células tratadas con el siRNA aleatorio y MG132 mostraron un aumento significativo de Beclin-1 con respecto a las células controles (Figura 12C).

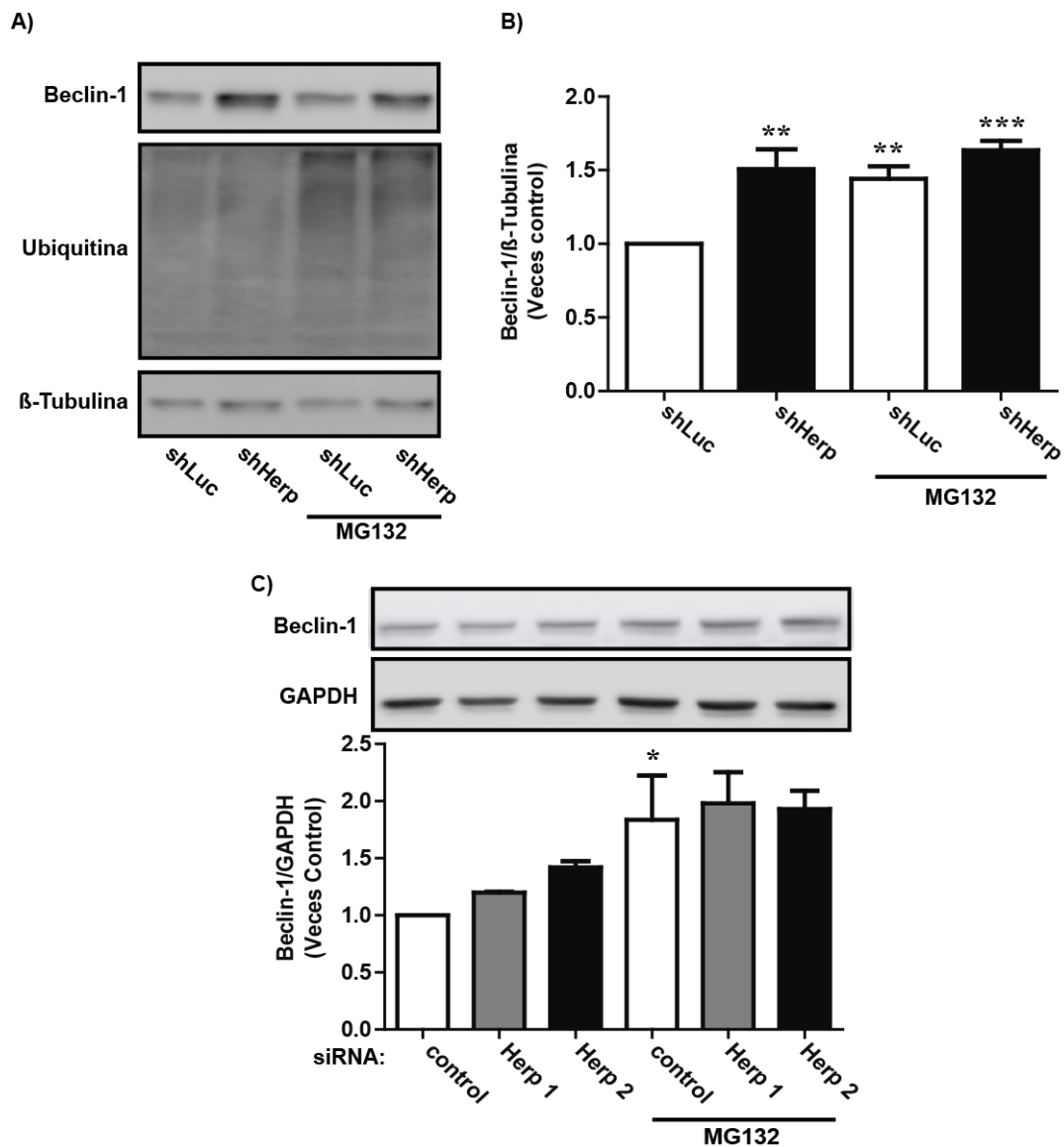


Figura 12. La poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 estaría relacionada a su degradación proteosomal.

Células HeLa KD de Herp (shHerp) y KD control (shLuc) se incubaron con MG132 20 μ M durante 6 h. **A)** En la parte superior se observa un Western Blot representativo de Beclin-1. En la parte central, los perfiles de ubiquitina fueron utilizados como control de inhibición del proteosoma por MG132. En la parte inferior, los niveles de β -Tubulina se utilizaron como control de carga. **B)** Gráfico que representa los niveles de Beclin-1 normalizados con los niveles de β -Tubulina y relativizados respecto al KD control (shLuc) sin estímulo. **C)** Células HeLa WT se transfecaron con siRNA de Herp 1, siRNA Herp 2 o siRNA control. En la figura se observa un Western blot representativo de Beclin-1 y β -Tubulina utilizado como control de carga. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de, al menos, 5 experimentos independientes en células KD y 3 experimentos independientes en células transfecadas con siRNA. Análisis mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. *p < 0,05 vs siRNA control. ** p < 0,01 ***p < 0,001 vs shLuc.

Con el fin de descartar la posibilidad de que los aumentos de Beclin-1 observados al inhibir el proteosoma sean producto de un aumento en la transcripción y traducción de esta proteína, se volvieron a realizar los experimentos de inhibición proteosomal utilizando actinomicina D y cicloheximida, para inhibir la transcripción y traducción general de proteínas, respectivamente.^{95,96}

La Figura 13 resume los resultados al incubar las células KD de Herp (shHerp) y Luc (shLuc) con MG132, actinomicina D (AcD) 3 µg/mL y cicloheximida (Chx) 25 µg/mL durante 6 h. Como se había observado previamente en la Figura 12, las células shHerp presentan una mayor cantidad de Beclin-1 que las células shLuc. De la misma manera, el tratamiento con MG132 por si solo aumentó la cantidad de Beclin-1 en las células KD controles. Por otra parte, el tratamiento sólo con actinomicina D y cicloheximida dieron resultados variables que no muestran diferencias importantes con respecto a las células controles. Finalmente, al tratar las células con MG132, actinomicina D y cicloheximida en conjunto no se observaron diferencias importantes con respecto a las células tratadas sólo con MG132.

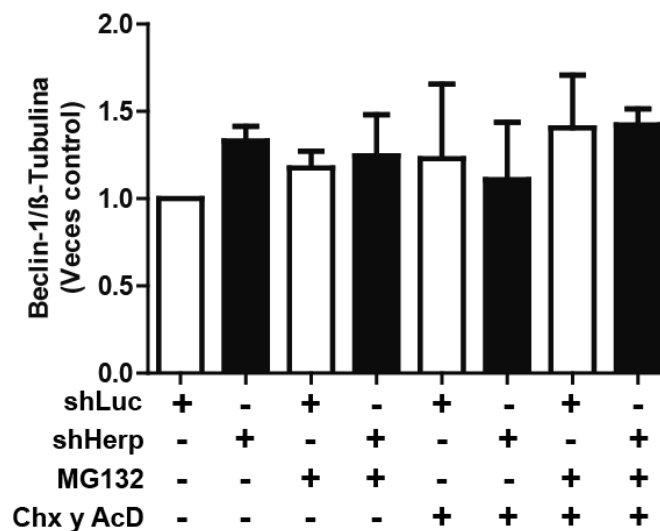


Figura 13. La poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 estaría relacionada a su degradación proteosomal.

Gráfico que representa los niveles de Beclin-1 en células KD de Herp (shHerp) y KD controles (shLuc) luego de ser incubadas con MG132 20 µM y/o Cicloheximida 25 µg/mL (Chx) y Actinomicina D 3 µg/mL (AcD) durante 6 h. Los niveles de Beclin-1 fueron normalizados con los niveles de β-Tubulina y relativizados respecto al KD control sin estímulo. Los datos corresponden al promedio ± SEM de 2 experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que Beclin-1 sería degradado por el proteosoma, ya que la inhibición del mismo con MG132 aumenta los niveles de Beclin-1. Más aun, el aumento de Beclin-1 observado cuando los niveles de Herp se encuentran disminuidos estaría relacionado con una disminución en la degradación de Beclin-1.

10.3 Efecto de la ubiquitin ligasa Hrd-1 en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1

Se ha descrito que Herp no solo interacciona directamente con la E3 ubiquitin ligasa Hrd-1, sino que regula su actividad ligasa permitiendo así la degradación proteosomal de sus sustratos específicos.⁸⁵ Con el fin de investigar el papel de la E3 ubiquitin ligasa Hrd-1 en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1, se utilizó un siRNA específico para Hrd-1 de forma de reducir los niveles de esta proteína.

En la Figura 14 se muestra la estandarización del siRNA de Hrd-1 utilizado a concentraciones de 50 y 100 nM. Como control, las células setransfectaron con un siRNA aleatorio comercial utilizado a una concentración de 100 nM. Los resultados obtenidos muestran que ambas concentraciones de interferente utilizadas disminuyen en alrededor de un 50% los niveles de Hrd-1.

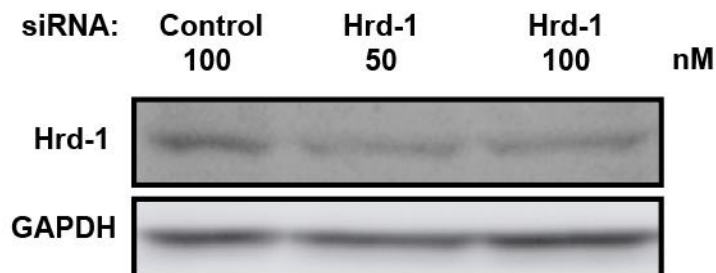


Figura 14. Estandarización del siRNA de Hrd-1.

Células HeLa WT se transfectaron con el siRNA de Hrd-1 a concentración final de 50 y 100 nM; o siRNA control 100 nM. Se muestran los geles correspondientes al Western blot de Hrd-1. Como control de carga se utilizaron los niveles de GAPDH.

Una vez estandarizado el uso del siRNA de Hrd-1 se procedió a determinar si la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 dependía de la E3 ubiquitin ligasa Hrd-1. Para este fin, las células HeLa KD de Herp (shHerp) y shLuc se transfectaron con el siRNA de Hrd-1 o siRNA aleatorio control. Por otra parte, las células se transfectaron con el plasmidio Beclin-1-Flag de forma de sobre-expresar la cantidad de Beclin-1 dentro de la célula. Posteriormente se inmunoprecipitó utilizando un anticuerpo anti-Flag y se realizó un Western blot con el anticuerpo Ub Lys48.

Como se mostró anteriormente (Figura 11A), las células shHerp presentaron menores niveles de Beclin-1 poli-ubiquitinado por Lys48 con respecto a las células shLuc (Figura 15A). Al igual que en las inmunoprecipitaciones anteriores, fue posible observar una banda alrededor de los 90 kDa sugerente de Beclin-1 unido a 4 subunidades de ubiquitina. Las células shLuc transfectadas con el interferente de Hrd-1 no mostraron diferencias significativas en la poli-ubiquitinación de Beclin-1 con respecto a las células shLuc. A su vez, las células shHerp transfectadas con el siRNA de Hrd-1 tampoco mostraron diferencias importante con respecto a las células shHerp sin interferente. Posteriormente y como control, la membrana fue deshibridizada y se realizó un Western blot de Beclin-1 (Figura 15B).

Estos resultados sugieren que la E3 ubiquitin ligasa Hrd-1 no estaría directamente involucrada en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1.

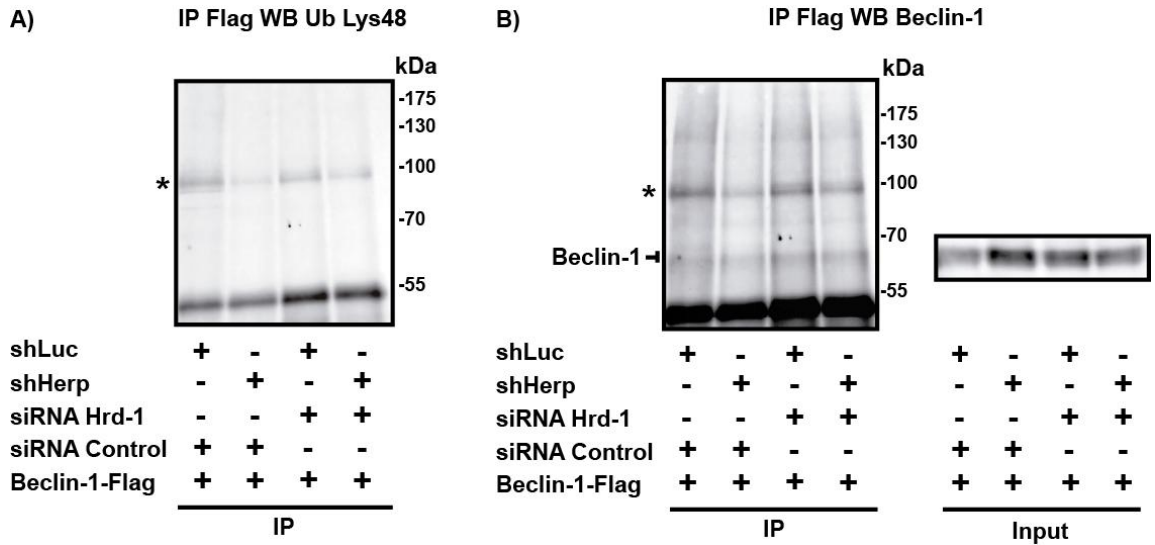


Figura 15. Hrd-1 no estaría involucrada en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1.

Células HeLa KD de Herp y KD control fueron transfectadas con siRNA de Hrd-1 o siRNA control y el plasmidio Beclin-1-Flag para luego **A)** inmunoprecipitar (IP) Flag y realizar un Western Blot (WB) para poli-ubiquitina unida por Lys48 (Ub Lys48). Se observaron bandas por encima de los 80 kDa (*). **B)** La membrana se deshidrizó y se realizó un Western blot de Beclin-1. Nuevamente se observaron bandas por encima de los 80 kDa (*). El input corresponde al lisado total de células.

10.4 Efecto de la disminución de Herp y Hrd-1 en los niveles de Beclin-1 y la activación de la autofagia

Para lograr la disminución en conjunto de las proteínas Herp y Hrd-1, las células HeLa WT se transfectaron con los siRNA específicos para Herp y Hrd-1, respectivamente. Las secuencias de ambos siRNA utilizados se analizaron mediante el algoritmo bioinformático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para certificar que no hubiera complementación de sus secuencias y pudieran ser utilizados al mismo tiempo.

La activación de la autofagia se analizó mediante el procesamiento de LC3-I a LC3-II y la degradación de p62 mediante Western blot en células HeLa WT transfectadas con los correspondientes siRNA y privadas de glucosa durante 6 h. Los niveles de Beclin-1 también se determinaron por Western blot en estas muestras (Figura 16).

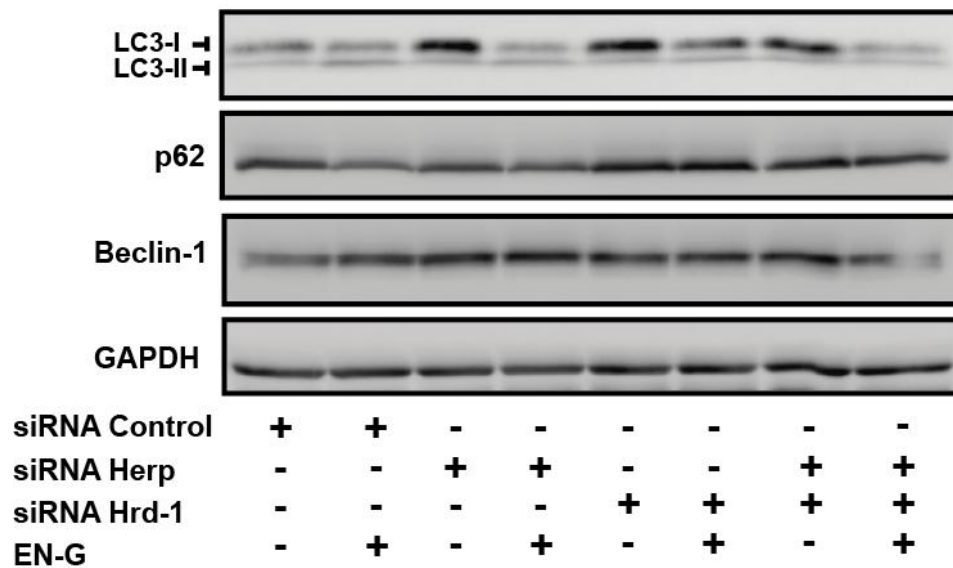


Figura 16. Activación de la autofagia en ausencia de Herp y/o Hrd-1.

Células HeLa WT se transfectaron con siRNA de Herp y/o Hrd-1 para luego ser privadas de glucosa (EN-G) durante 6 h. La figura muestra los Western blot representativos para LC3, p62 y Beclin-1. Como control de carga se utilizaron los niveles de GAPDH.

La Figura 17 muestra el análisis del procesamiento de LC3-I a LC3-II del Western blot mostrado en la Figura 16. La privación de glucosa aumentó significativamente los niveles de LC3-II con respecto a los controles con glucosa en las células tratadas con el siRNA control; siRNA de Herp; y los siRNA de Hrd-1 y Herp en conjunto. Sin embargo, las células privadas de glucosa que fueron tratadas con el interferente de Hrd-1 por sí solo, no mostraron diferencias significativas en el procesamiento de LC3 con respecto a su control con glucosa. Por otra parte, las células privadas de glucosa que fueron transfectadas con el siRNA de Herp mostraron una tendencia al aumento de LC3-II en comparación a las células privadas de glucosa que fueron tratadas con el siRNA control, como había sido descrito previamente por nuestro laboratorio.

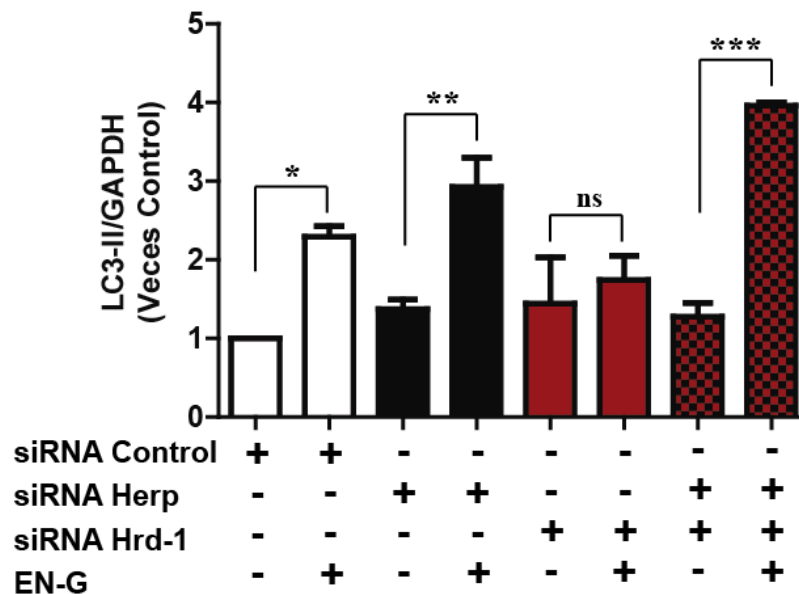


Figura 17. Análisis de la autofagia mediante LC3 en ausencia de Herp y/o Hrd-1.

Gráfico representa los niveles de LC3-II en células HeLa WT transfectadas con siRNA de Herp, siRNA de Hrd-1, ambos o siRNA control que fueron mantenidas en medio completo o privadas de glucosa (EN-G) por 6 h. Los niveles de LC3 se normalizaron con los niveles de GAPDH y relativizados respecto al siRNA control sin estímulo. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Análisis mediante ANOVA de dos vías seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. *p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 vs sus respectivos siRNA controles con glucosa. ns indica ninguna significancia estadística.

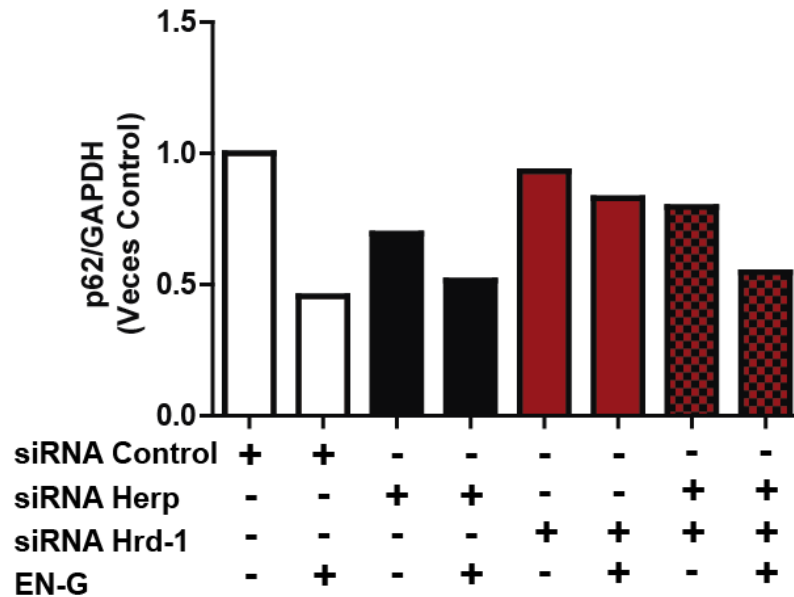


Figura 18. Análisis de la autofagia mediante p62 en ausencia de Herp y/o Hrd-1.

Gráfico que representa los niveles de p62 en células HeLa WT transfectadas con siRNA de Herp, siRNA de Hrd-1, ambos o siRNA control que fueron mantenidas en medio completo o privadas de glucosa (EN-G) por 6 h. Los niveles de p62 se normalizaron con los niveles de GAPDH y relativizados respecto al siRNA control sin estímulo. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de 1 experimento.

En la Figura 18 se muestra el análisis de la degradación de p62 del Western blot mostrado en la Figura 16. Nuestros resultados señalan que la privación de glucosa durante 6 h produjo una disminución de p62 con respecto a su control con glucosa en las células transfectadas con el siRNA control. El tratamiento con el siRNA de Herp y los siRNA de Hrd-1 y Herp en conjunto produjeron una tendencia a la disminución de p62 tanto en las células privadas como con glucosa, sugiriendo un aumento en la autofagia basal. Sin embargo, las células privadas de glucosa que se transfectaron sólo con el siRNA de Hrd-1 no mostraron grandes diferencias en sus niveles de p62 con respecto a las células no privadas.

En la Figura 19 se muestra el análisis de los niveles de Beclin-1 en condiciones basales (con glucosa) que fueron presentados en la Figura 16. Como ya se había observado anteriormente (Figura 12), los resultados indican una tendencia al aumento de los niveles de Beclin-1 en las células tratadas con el siRNA de Herp con respecto a

las células con el siRNA control. Sin embargo, al transfectar las células con el siRNA de Hrd-1 por sí solo o los siRNA de Herp y Hrd-1 en conjunto la tendencia al aumento se vio disminuida.

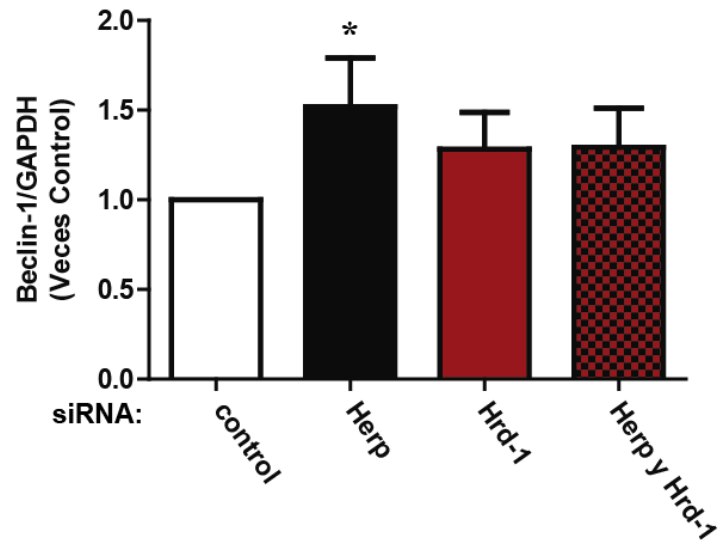


Figura 19. Hrd-1 no afecta los niveles de Beclin-1.

El gráfico representa los niveles de Beclin-1 en células HeLa WT transfectadas con siRNA de Herp, siRNA de Hrd-1, ambos o siRNA control, normalizados con los niveles de GAPDH y relativizados respecto al siRNA control. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Análisis mediante Test de Student. * $p < 0,05$ vs siRNA control.

Finalmente, se estudió la redistribución de GFP-LC3 a las vesículas autofágicas mediante microscopía confocal en células U2OS GFP-LC3 KD para Herp (shHerp) o controles (shLuc) que fueron transfectadas con el siRNA de Hrd-1 o siRNA aleatorio control según corresponda. Las células se mantuvieron en medio con glucosa o fueron privadas de la misma durante 6 h (Figura 20).

La Figura 21 corresponde a la cuantificación de las células con vesículas autofágicas de la Figura 20. Los resultados indican que las células shLuc transfectadas con el siRNA control y privadas de glucosa muestran una tendencia al aumento en la cantidad de vesículas GFP-LC3 positivas que las células no privadas de glucosa. Por otra parte, las células shHerp privadas de glucosa mostraron una mayor tendencia al aumento de vesículas GFP-LC3 positivas que las células shLuc privadas de glucosa.

Cabe destacar que las células shLuc que fueron tratadas con el siRNA de Hrd-1 no mostraron prácticamente ninguna diferencia con respecto a su control con glucosa. Mientras que las células shHerp transfectadas con el siRNA de Hrd-1 mostraron una tendencia al aumento de vesículas GFP-LC3 positivas tanto en condiciones con o sin glucosa.

En resumen, los datos sugieren que las células tratadas con el siRNA de Herp tienen un aumento de la autofagia, evidenciado por el mayor procesamiento de LC3-I a LC3-II al ser privadas de glucosa y la menor cantidad de p62. Bajo las mismas condiciones experimentales, las células tratadas con el interferente de Hrd-1 mostraron menores niveles de procesamiento de LC3-I a LC3-II y degradación de p62, indicando una menor activación de la autofagia. Sin embargo, al silenciar ambas proteínas se observaron cambios semejantes a lo ocurrido en las células siRNA de Herp.

En cuanto a Beclin-1, las células siRNA de Herp presentaron mayores niveles de esta proteína como había sido previamente observado. Las células tratadas solamente con el siRNA de Hrd-1 exhibieron una tendencia similar a las tratadas con los interferentes de Hrd-1 y Herp en conjunto. Sin embargo, estos cambios no tuvieron la misma tendencia al aumento observado al interferir Herp por sí solo.

Finalmente, el análisis de la redistribución de GFP-LC3 a las vesículas autofágicas mostró una tendencia muy similar a lo observado al analizar el procesamiento de LC3. Donde las células KD de Herp mostraron una importante redistribución de LC3, a diferencia de las células transfectadas con el siRNA de Hrd-1.

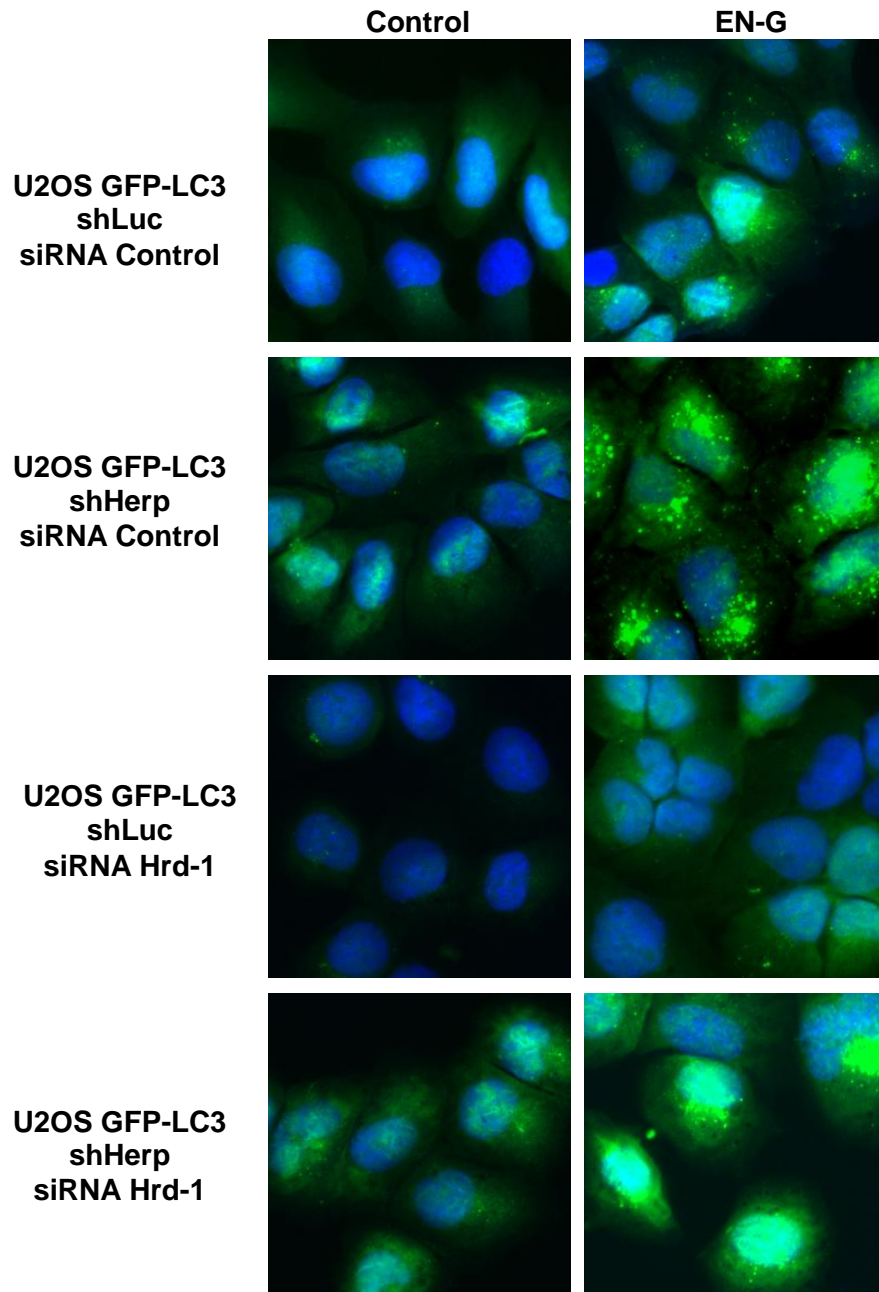


Figura 20. Efecto de Herp y/o Hrd-1 en la redistribución de GFP-LC3 a las vesículas autofágicas.

Las células U2OS GFP-LC3 KD de Herp (shHerp) y KD control (shLuc) se transfectaron con siRNA de Hrd-1 o siRNA control y luego privadas de glucosa (EN-G) durante 6 h. Los núcleos se marcaron con Hoescht. GFP-LC3 se visualizó en un microscopio confocal. Las imágenes obtenidas se desconvolucionaron en el programa Huygens Professional y procesadas con ayuda del software Image J. Las fotografías son representativas de 2 experimentos independientes y 2 repeticiones en cada condición.

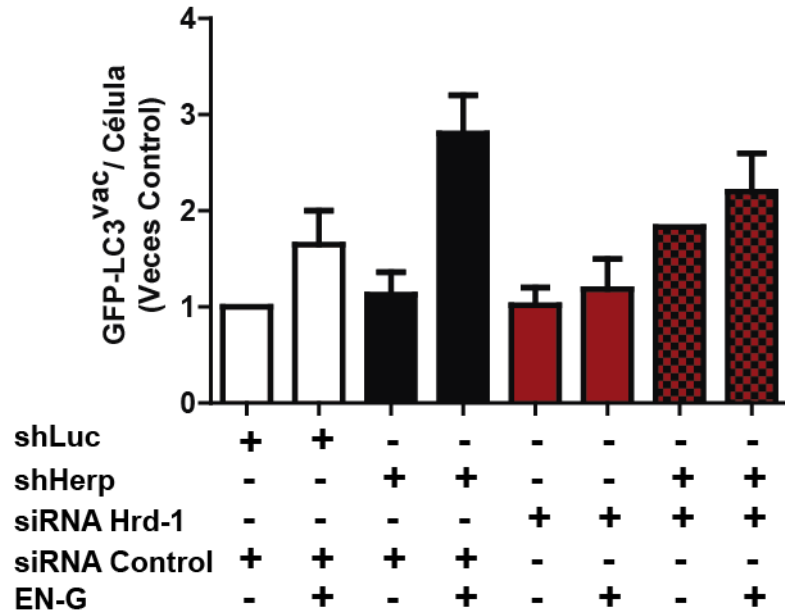


Figura 21. Herp y Hrd-1 modulan la localización de GFP-LC3 en los autofagosomas.

Las células U2OS GFP-LC3 KD de Herp y KD control se transfectaron con el siRNA de Hrd-1 o siRNA control y luego privadas de glucosa (EN-G) durante 6 h. La redistribución de GFP-LC3 a las vacuolas autofágicas se visualizó en un microscopio confocal. El número de vacuolas GFP-LC3 positivas se cuantificó mediante el programa Huygens Professional. El número total de células en el campo fue cuantificado con el software Image J. El gráfico representa la cantidad de vacuolas GFP-LC3 positivas por célula. Los valores representan el promedio de 2 experimentos independientes y 2 fotografías por cada condición.

11. DISCUSIÓN

11.1 Poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 dependiente de Herp

Beclin-1 es una proteína indispensable para la activación de la autofagia al ser parte del complejo PI3K-III encargado de la nucleación de la membrana pre-autofagosomal y el reclutamiento de distintas proteínas necesarias para el desarrollo de la autofagia.^{4,5} En condiciones basales Beclin-1 se encuentra unido a la proteína represora Bcl-2. La disociación de Beclin-1 y Bcl-2 es indispensable para la activación de la autofagia.²⁵ Por este motivo ambas proteínas se encuentran sometidas a varias modificaciones post-traduccionales que permiten regular su interacción.²⁰ Dentro de estas, se ha visto que la E3 ubiquitin ligasa TRAF6 puede poli-ubiquitinar por Lys63 a Beclin-1, permitiendo así su disociación de Bcl-2 y la activación de la autofagia.^{31,33} Otros estudios han señalado que Beclin-1 también sería poli-ubiquitinado por Lys11 y Lys48; modificaciones que serían reconocidas como una señal de degradación proteosomal de Beclin-1.^{34,36}

Herp es una proteína de RE que aumenta rápida y significativamente sus niveles frente al estrés de RE.⁷⁵ Se ha descrito que Herp estaría vinculada con la vía de degradación ERAD.⁸⁴ Recientemente nuestro laboratorio descubrió que Herp actúa como un modulador negativo de la autofagia y que esta función estaría relacionada con una disminución en los niveles de Beclin-1.

Utilizando la técnica de inmunoprecipitación y anticuerpos específicos anti-ubiquitina unida por Lys48 se observó que células KD para Herp presentaron una disminución significativa de Beclin-1 poli-ubiquitinado por Lys48. Por lo que se concluyó que Herp regula positivamente la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1. De esta manera, Herp cumpliría un papel relevante tanto en la vía de degradación ERAD como en la regulación de la autofagia. Evidencias de comunicación entre estas dos vías de degradación han sido previamente reportadas en la literatura. Las proteínas α 1-antitripsina y fibrinógeno mutante son normalmente eliminadas mediante la vía ERAD. Sin embargo, al encontrarse en altos niveles dentro de la célula estas proteínas

son capaces de saturar el ERAD, generando agregados de proteínas que finalmente son degradados mediante autofagia.⁹⁷⁻⁹⁹ Por lo tanto, la autofagia actuaría como una vía de compensación cuando el ERAD es sobrepasado por la cantidad de proteínas mal plegadas. La degradación de la proteína disferlina constituye otro ejemplo de comunicación entre el ERAD y la autofagia. Se ha descrito que la disferlina WT sería degradada por la vía ERAD, mientras que la disferlina mutante, la cual forma agregados de proteínas sería degradada mediante la autofagia.⁴⁰ De esta manera el ERAD actuaría como un mecanismo de degradación de proteínas específicas, mientras que la autofagia se encargaría de degradar grandes agregados de proteínas mal plegadas o mutantes que no podrían ser degradados por el ERAD. A pesar de estos ejemplos en la literatura, los mecanismos por el cual la autofagia y el ERAD se comunican aun permanecen sin ser descubiertos. La vinculación de Herp con ambas vías de degradación abre la posibilidad de que esta proteína sea un factor clave en la regulación y comunicación del ERAD y la autofagia.

Como se informó previamente, en todas las inmunoprecipitaciones de Beclin-1 y Ubiquitina realizadas en esta tesis se pudo apreciar una banda alrededor de los 90 kDa. Debido a la masa molecular de Beclin-1 (60 kDa) y de cada subunidad de ubiquitina (8,5 kDa), esta banda se asoció a Beclin-1 unido covalentemente a por lo menos 4 subunidades de ubiquitina, lo cual daría una masa total de 94 kDa que concordaría con las bandas encontradas en los geles. Otros estudios han reportado que se necesita una cadena con un mínimo de 4 subunidades de ubiquitina unidas por su Lys48 para ser reconocidas por el proteosoma como una señal de degradación de la proteína modificada.^{63,69} Estos resultados sugirieron entonces que Herp podría estar regulando la degradación proteosomal de Beclin-1, al modular positivamente su poli-ubiquitinación por Lys48.

La poli-ubiquitinación por Lys63 de Beclin-1 ha sido descrita como un activador de la autofagia.³³ Sin embargo, al utilizar un anticuerpo específico que reconoce cadenas de poli-ubiquitina unidas por Lys63 no se obtuvieron resultados. Esto último probablemente tiene relación con el modelo de estudio utilizado por Shi et al. 2010, en el cual se trabajó con la línea celular de macrófagos murina RAW 264.7.³³ Debido a esto, cabe la posibilidad de que el tipo de poli-ubiquitinación de Beclin-1 dependa del tipo celular.

La poli-ubiquitinación por Lys48 está generalmente relacionada con la degradación proteosomal de la proteína modificada.⁶⁷ Por otro lado, la privación de glucosa es un conocido estímulo inductor de autofagia. Se postuló entonces la posibilidad de que la privación de glucosa pudiera ejercer un efecto en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 y de esta forma activar la autofagia. Sin embargo, la privación de glucosa no tuvo efectos importantes en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1. Por lo que la poli-ubiquitinación por Lys48 y degradación proteosomal de Beclin-1 probablemente sean un proceso constitutivo e independiente a la activación de la autofagia por privación de glucosa.

11.2 Degradación proteosomal de Beclin-1

Como se mencionó anteriormente, existen reportes de que la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 está relacionada con la degradación proteosomal de esta proteína.³⁶ Para determinar si la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 dependiente de Herp conduce a su degradación proteosomal se utilizó MG132, un conocido inhibidor del proteosoma, para luego realizar ensayos de Western blot. La incubación con MG132 por un periodo de 6 h produjo un aumento significativo de Beclin-1 tanto en las células KD control como siRNA control, abriendo la posibilidad de que la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 tenga como objetivo regular su degradación vía proteosomal.

Como había sido previamente descrito por nuestro Laboratorio, las células KD de Herp mostraron un aumento significativo de Beclin-1 con respecto a las células KD controles. Cabe destacar que la inhibición proteosomal con MG132 por 6 h no mostró diferencias significativas en la cantidad de Beclin-1 en las células KD de Herp. Más aún, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de Beclin-1 en las células KD de Herp y las células KD controles incubadas con MG132. Esto último es indicativo de que la disminución en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 producido por la disminución de Herp provocaría una acumulación de Beclin-1 similar a la observada al inhibir el proteosoma con MG132, lo que a su vez sugiere que Herp regula la degradación proteosomal de Beclin-1 mediante su poli-ubiquitinación por Lys48 y degradación proteosomal.

Al utilizar los interferentes de Herp, el aumento de Beclin-1 fue menor al observado en las células KD. Sin embargo, esto puede ser explicado debido a que la disminución de Herp producto de los interferentes podría no ser tan eficiente como la producida en las células KD. A su vez, el uso de MG132 durante 6 h no mostró diferencias significativas en las células que se transfectaron con los siRNA de Herp, sin embargo, la tendencia al aumento fue muy notoria. Probablemente al realizar un número mayor de experimentos este dato podría llegar a ser consolidado.

Para corroborar que el aumento de los niveles de Beclin-1 sean el producto de una disminución en su degradación proteosomal y no debido a un aumento en la transcripción y traducción de esta proteína se repitieron los experimentos utilizando MG132 pero a su vez, incubando con actinomicina D y cicloheximida de forma de inhibir la transcripción y traducción, respectivamente. Los resultados obtenidos al incubar las células KD de Herp con MG132, actinomicina D y cicloheximida durante 6 h no mostraron diferencias importantes con respecto a las células KD de Herp tratadas sólo con MG132. Estos resultados sugieren que el aumento de Beclin-1 luego de inhibir el proteosoma es producto de una disminución de la degradación de esta proteína y no un aumento en su síntesis.

Si bien los resultados de los experimentos con actinomicina D y cicloheximida corresponden a sólo 2 experimentos independientes, otros autores han realizado experimentos similares que validarían nuestros resultados. Los resultados obtenidos por Du et al. 2009, demuestran que Beclin-1 aumenta significativamente sus niveles a las 5 h de haberse inhibido el proteosoma utilizando lactacistina. Para eliminar la posibilidad de un aumento en la transcripción de Beclin-1 producto del tratamiento con lactacistina, los investigadores realizaron RT-qPCR de los niveles del mRNA de Beclin-1, observándose un aumento significativo a partir de las 12 h de tratamiento.³⁷ Si bien estos experimentos fueron llevados a cabo en neuronas del mesencéfalo de ratas, sus resultados señalan que Beclin-1 aumentaría significativamente sus niveles a partir de las 5 h de inhibición proteosomal y que este aumento no estaría ligado a una mayor síntesis de la proteína a estos tiempos, lo cual corroboraría los resultados obtenidos en nuestro modelo. Otro trabajo relevante para validar nuestros datos corresponde al estudio realizado por Platta et al. 2011 donde mediante experimentos con cicloheximida se determinó que la vida media de Beclin-1 corresponde a 10 h. Platta et al. 2011 confirmaron estos resultados al trabajar con cicloheximida y los inhibidores MG132 y lactacistina, donde observaron que inhibir la traducción y la inhibición proteosomal durante 10 h generaba un aumento de Beclin-1.³⁴

11.3 Efecto de Hrd-1 en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 dependiente de Herp

Se ha descrito que Herp interactúa y regula varias E3 ubiquitin ligasas como POSH, SIAH1a y Hrd-1.^{85,88,89} Dentro de éstas, Hrd-1 ha sido la más estudiada, siendo ambas proteínas parte del complejo de retro-translocación utilizado en el ERAD para transportar proteínas mal plegadas.⁸⁴ Se ha visto, que Hrd-1 también es capaz de poli-ubiquitinar proteínas citoplasmáticas tales como p53 para que luego sean degradadas en el proteosoma.¹⁰⁰

Los resultados obtenidos indican que los perfiles de ubiquitinación de las células transfectadas con el interferente de Hrd-1 no cambian en comparación a los de las células con el siRNA aleatorio control. El conjunto de estos datos sugieren que Hrd-1 no estaría involucrado en la poli-ubiquitinación por Lys48 mediada por Herp y por tanto esta podría estar regulando otra ubiquitin ligasa como SIAH1a y POSH. Recientemente Platta et al. 2011 describieron que la ubiquitin ligasa Nedd4 sería capaz de interaccionar con Beclin-1 y poli-ubiquitarlo por Lys11 y de esta forma induciendo su degradación a través del proteosoma.³⁴ Futuros estudios se necesitan para investigar si la E3 ubiquitin ligasa Nedd4 interacciona con Herp y si esta interacción se encuentra relacionada con la poli-ubiquitinación por Lys48 y degradación proteosomal de Beclin-1 mediada por Herp.

11.4 Efecto de Herp y Hrd-1 en la activación de la autofagia

Para determinar el efecto de la disminución de Herp y la ubiquitin ligasa Hrd-1 en la activación de la autofagia, las células HeLa WT se transfectaron con interferentes para ambas proteínas y luego se midieron los niveles de Beclin-1 y la activación de la autofagia mediante el procesamiento de LC3 y la degradación de p62. La redistribución de LC3 a las vesículas autofágicas fue medida en células U2OS GFP-LC3 KD para Herp transfectadas con el siRNA para Hrd-1 o un siRNA aleatorio como control.

Los resultados sugieren que el silenciamiento de Herp permite una mayor activación de la autofagia, medida por el procesamiento de LC3-I a LC3-II. p62 es una proteína degradada durante la fase final de la autofagia en la que el autofagosoma se une al lisosoma, por lo que su disminución es considerada un buen marcador para evaluar autofagia.¹² Las células transfectadas con el siRNA de Herp mostraron una disminución de p62 tanto en condiciones con o sin glucosa, apuntando a una importante activación de la autofagia en ambos casos. Las células U2OS GFP-LC3 KD de Herp mostraron una importante redistribución de GFP-LC3, corroborando el mayor procesamiento de LC3 y confirmando una mayor activación de autofagia al disminuir Herp. Esta activación estaría ligada a la capacidad de Herp de regular la poli-ubiquitinación y

degradación proteosomal de Beclin-1, ya que una disminución de Herp conlleva a una disminución en la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 y por lo tanto una menor degradación proteosomal. Este aumento en los niveles de Beclin-1 estaría relacionado con una mayor activación de la autofagia, especialmente al someter a las células a estímulos pro-autofágicos tales como la privación de glucosa.

En el caso de las células privadas de glucosa se trataron con el interferente de Hrd-1 los datos sugieren una menor activación de la autofagia evaluada tanto por el procesamiento de LC3-I a LC3-II como por la degradación de p62. Las células U2OS GFP-LC3 transfectadas con el interferente de Hrd-1 también mostraron una menor redistribución de LC3 hacia las vesículas autofágica.

Esta disminución en la autofagia, podría encontrarse relacionada con la función de Hrd-1 de poli-ubiquitar y degradar a p53. Está descrito que p53 actúa como un factor transcripcional clave en procesos de muerte celular y respuesta al estrés como daño al ADN, hipoxia y activación de oncogenes, entre otros.¹⁰¹ p53 se encuentra altamente regulado mediante diversas modificaciones post-traduccionales entre ellas la poli-ubiquitinación. En condiciones basales p53 es constantemente poli-ubiquitinado y degradado por el proteosoma. La poli-ubiquitinación de p53 es mediada por varias E3 ubiquitin ligasas como: COP-1, Pirh2, mdm2 y Hrd-1.¹⁰²⁻¹⁰⁴ La función de p53 con respecto al control de la autofagia aún es motivo de controversia, debido a su capacidad de inhibir o activar la autofagia dependiendo de su localización subcelular. Se ha visto que p53 sería capaz de actuar como factor transcripcional de varios genes pro-autofágicos como AMPK, DAPK y DRAM, entre otros,¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ en tanto p53 citoplasmático inhibiría la autofagia. Se ha observado que varios estímulos pro-autofágicos como el estrés de RE, rapamicina o la privación de nutrientes disminuyen los niveles de p53 mediante su degradación proteosomal.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ De esta manera, la disminución de Hrd-1 causada por el interferente podría dar cuenta de una acumulación citoplasmática de p53, inhibiendo así el proceso autofágico.

Por otra parte, la disminución de la autofagia en las células transfectadas con el siRNA de Hrd-1 también podría ser explicada mediante la interacción de Hrd-1 y Herp. Como se mencionó anteriormente Hrd-1 y Herp forman parte del complejo retrotranslocón que

estaría encargado del traspaso de proteínas mal plegadas desde el lumen del RE hacia el citoplasma para ser poli-ubiquitinadas y degradadas en el proteosoma.⁸⁴ Herp interacciona directamente con Hrd-1 y regula su actividad ubiquitin ligasa permitiendo la degradación de sustratos específicos.⁸⁵ Más aún, Herp es capaz de regular la degradación de Hrd-1.⁸⁶ Por otro lado, Herp tiene una vida media corta de alrededor de 4 h, ya que es rápidamente poli-ubiquitinado y degradado en el proteosoma,^{77,78} por lo que es probable que Hrd-1 también regule la degradación de Herp. Ante esta posibilidad, una disminución de los niveles de Hrd-1 produciría una estabilización de Herp. Los resultados presentados previamente por nuestro laboratorio en conjunto con los resultados ya exhibidos en esta tesis muestran que Herp actúa como un regulador negativo de la autofagia. Por lo que el aumento en la estabilidad de Herp provocado por la disminución de Hrd-1 explicaría la disminución en la autofagia observada en las células transfectadas con el siRNA de Hrd-1.

Cabe destacar que al silenciar tanto Hrd-1 como Herp los niveles de activación de la autofagia fueron similares a los observados al silenciar Herp por sí solo. Este resultado avalaría la hipótesis de que Hrd-1 controlaría la degradación de Herp de esta forma activando la autofagia.

Si bien los resultados obtenidos al medir el procesamiento de LC3 y la redistribución de GFP-LC3 a las vesículas autofágicas no son exactamente iguales, esto se podría explicar ya que el procesamiento de LC3 fue medido en células HeLa WT tratadas con los interferentes respectivos mientras que la redistribución de GFP-LC3 se midió en células U2OS que fueron tratadas con el lentivirus para generar células KD de Herp. Las diferencias entre estos dos tipos celulares y las distintas estrategias utilizadas para disminuir los niveles de Herp podrían dar cuenta de las diferencias entre las mediciones obtenidas.

En cuanto a Beclin-1, el uso del interferente de Herp nuevamente mostró una tendencia al aumento. Sin embargo, el uso del siRNA de Hrd-1 y el siRNA de Herp en conjunto, o el siRNA de Hrd-1 por sí solo, no provocó un aumento considerable de los niveles de Beclin-1. Esto último concuerda con el resultado obtenido previamente que

muestra que la ubiquitin ligasa Hrd-1 no estaría involucrada en la poli-ubiquitinación por Lys48 y degradación proteosomal de Beclin-1.

Por último, en una publicación en preparación de nuestro laboratorio se destacó que no solo los niveles de Beclin-1, sino que también los de Atg5 se ven aumentados al reducir Herp dentro de la célula. La proteína Atg5 cumple un papel importante en la autofagia al regular la expansión de los autofagosomas nacientes y el procesamiento de LC3.¹¹⁰ Nuestros resultados (Figura 16) avalan la posibilidad de que LC3 se vea aumentado al silenciar Herp, por lo tanto existe la posibilidad de que Herp sea participe de la degradación de múltiples proteínas pro-autofágicas y de esta forma esté regulando la activación de la autofagia. Futuras investigaciones deberán desentrañar el mecanismo por el cual Herp regula la autofagia y cómo esta proteína sería capaz de permitir la comunicación entre las diferentes vías de degradación dentro de la célula.

Considerados en su totalidad los resultados obtenidos solo comprueban parcialmente la hipótesis propuesta. Si bien se pudo apreciar como Herp regula negativamente la autofagia mediante la poli-ubiquitinación en Lys48 de Beclin-1 y su consiguiente degradación proteosomal, la ubiquitin ligasa Hrd-1 no sería la encargada de la poli-ubiquitinación en Lys48 dependiente de Herp.

12. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Existen una serie de limitaciones del estudio realizado que deben ser mencionadas para que sean consideradas al momento de analizar los resultados obtenidos y comprender mejor el trabajo realizado.

La autofagia es un proceso continuo en el cual tanto los componentes citoplasmáticos que son secuestrados como también muchos componentes de la misma maquinaria molecular de la autofagia son degradados continuamente a medida que los autofagosomas se fusionan con los lisosomas. Muchos marcadores autofágicos utilizados en este estudio tales como LC3 y p62 son continuamente degradados a medida que la autofagia es activada, en este caso, por privación de glucosa. Por esta razón, la medición del flujo autofágico es de gran importancia para poder evaluar el proceso autofágico de forma correcta. El uso de inhibidores de la autofagia como Bafilomicina, una droga que permite prevenir la maduración de las vesículas autofágicas al inhibir la fusión entre autofagosomas y lisosomas, son requeridos para detener el flujo autofágico y de esta forma medir de forma total los niveles de procesamiento de LC3. Nuestros experimentos fallan en utilizar algún inhibidor del flujo autofágico que nos permita analizar los niveles totales de procesamiento de LC3.

Otra limitación del estudio constituye la medición de poli-ubiquitinación mediante Western blot. La poli-ubiquitinación es un proceso continuo y reversible, por lo que las proteínas blanco y las subunidades de ubiquitina son constantemente asociadas y disociadas entre sí por medio de proteínas E3 ubiquitin ligasas específicas y proteínas desubiquitinantes, respectivamente. Al mismo tiempo el proteosoma se encarga de degradar las proteínas marcadas para que las subunidades de ubiquitina sean reutilizadas. Por esta razón, el uso de inhibidores de proteínas deubiquitinantes e inhibidores proteosomales podría haber mejorado la reproducción de los datos obtenidos al determinar la poli-ubiquitinación de Beclin-1.

Por último es necesario mencionar las fallas de la estrategia utilizada para determinar si la E3 ubiquitin ligasa Hrd-1 es la encargada de la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 mediada por Herp. Si bien se probó que el uso del siRNA para Hrd-1 silenciaba su traducción en alrededor de un 50% esto no significa que la actividad de la

proteína se haya reducido de la misma manera. Nuestros experimentos fallan en determinar si la reducción de Hrd-1 dentro de la célula significa una menor actividad E3 ubiquitin ligasa de esta proteína y si esta disminución afectaría la poli-ubiquitinación de Beclin-1. La actividad de Hrd-1 podría haber sido medida, por ejemplo, mediante la medición de otra proteína blanco de Hrd-1, como p53.

13. CONCLUSIONES

- Herp modula positivamente la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1. Donde la privación de glucosa no afectaría los perfiles de poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1
- La poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 estaría relacionada con su degradación proteosomal.
- La E3 ubiquitin ligasa Hrd-1 no sería responsable de la poli-ubiquitinación por Lys48 de Beclin-1 mediada por Herp.

14. REFERENCIAS

1. Aránguiz, P. *et al.* Autofagia del cardiomiocito: ¿Un nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular? *Revista Chilena de Cardiología* **25**, 331–338 (2006).
2. Cuervo, A. M. Autophagy: many paths to the same end. *Molecular and cellular biochemistry* **263**, 55–72 (2004).
3. Majeski, A. E. & Dice, J. F. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 2435–44 (2004).
4. Liu, B *et al.* Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta pharmacologica Sinica* **31**, 1154–64 (2010).
5. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics* **43**, 67–93 (2009).
6. Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology* **9**, 1102–1109 (2007).
7. Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M. & Kim, D.-H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters* **584**, 1287–1295 (2010).
8. Mizushima, N. *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395–398 (1998).
9. Geng, J. & Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO reports* **9**, 859–864 (2008).
10. Ichimura, Y. *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488–492 (2000).
11. Klionsky, D. J. *et al.* Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* **3**, 181–206 (2007).
12. Serhiy, P. *et al.* p62 / SQSTM1 Binds Directly to Atg8 / LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 24131–24145 (2007).
13. Abrahamsen, H. *et al.* Ubiquitination and phosphorylation of Beclin 1 and its binding partners: Tuning class III phosphatidylinositol 3-kinase activity and tumor suppression. *FEBS letters* **586**, 1584–91 (2012).

14. Vanhaesebroeck Bart, *et al.* The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Review Molecular Cell Biology* **11**, 329–341 (2010).
15. Backer, J. M. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *The Biochemical journal* **410**, 1–17 (2008).
16. Simonsen, A. & Tooze, S. a Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *The Journal of cell biology* **186**, 773–82 (2009).
17. Funderburk, S. F. *et al.* The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in cell biology* **20**, 355–62 (2010).
18. Thoresen, S. B. *et al.* phosphatidylinositol 3-kinase class III sub-complex containing VPS15, VPS34, Beclin 1, UVRAG and BIF-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic. *Experimental cell research* **316**, 3368–78 (2010).
19. He, C. & Levine, B. The Beclin 1 interactome. *Current opinion in cell biology* **22**, 140–9 (2010).
20. Kang, R. *et al.* The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation* **18**, 571–580 (2011).
21. Itakura, E. *et al.* Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. **19**, 5360–5372 (2008).
22. Fimia, G. M. *et al.* Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**, 1121–5 (2007).
23. Sun, Q. *et al.* Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19211–6 (2008).
24. Zhong, Y. *et al.* Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology* **11**, 468–76 (2009).
25. Pattingre, S. *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927–39 (2005).
26. Maiuri, M. C. *et al.* Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO journal* **26**, 2527–39 (2007).

27. Oberstein, A., *et al.* Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *The Journal of biological chemistry* **282**, 13123–32 (2007).
28. Sinha, S. & Levine, B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* **27**, 1–21 (2008).
29. Wei, Y. *et al.* JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell* **30**, 678–88 (2008).
30. Chen, D. *et al.* Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy. *The Journal of biological chemistry* **285**, 38214–23 (2010).
31. Zalckvar, E. *et al.* Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy* **5**, 1–3 (2009).
32. Shi, C.-S. & Kehrl, J. H. Traf6 and A20 differentially regulate TLR4-induced autophagy by affecting the ubiquitination of beclin 1. *Autophagy* **6**, 986–987 (2010).
33. Shi, C.-S. & Kehrl, J. H. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Science signaling* **3**, 1–10 (2010).
34. Platta, H. W. *et al.* Nedd4-dependent lysine-11-linked polyubiquitination of the tumor suppressor Beclin-1. *Biochemical Journal* **441**, 399–406 (2012).
35. Liu, J. *et al.* Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* **147**, 223–34 (2011).
36. Xu, C. *et al.* Functional interaction of heat shock protein 90 and Beclin 1 modulates Toll-like receptor-mediated autophagy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 2700–10 (2011).
37. Du, Y. *et al.* An insight into the mechanistic role of p53-mediated autophagy induction in response to proteasomal inhibition-induced neurotoxicity. *Autophagy* **5**, 663–675 (2009).
38. Yorimutsu, T. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Triggers Autophagy. *The Journal of biological chemistry* **281**, 30299–30304 (2006).
39. Yorimutsu, T. & Klionsky, D. J. Endoplasmic Reticulum Stress A New Pathway to Induce Autophagy. *Autophagy* **3**, 160–162 (2007).

40. Fujita, E. *et al.* Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Human molecular genetics* **16**, 618–629 (2007).
41. Ding, W.-X. *et al.* Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *The American journal of pathology* **171**, 513–24 (2007).
42. Schröder, M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**, 862–894 (2007).
43. Schröder, M. & Kaufman, R. J. ER stress and the unfolded protein response. *Mutation research* **569**, 29–63 (2005).
44. Groenendyk, J. *et al.* Biology of Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart. *Circulation Research* **107**, 1185–1197 (2010).
45. Xu, C. *et al.* Endoplasmic reticulum stress : cell life and death decisions. *Apoptosis* **115**, 2656–2664 (2005).
46. Wu, J. & Kaufman, R. J. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell death and differentiation* **13**, 374–384 (2006).
47. Bravo, R. *et al.* Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**, 16–20 (2012).
48. Ma, Y. & Hendershot, L. M. The Unfolding Tale of the Unfolded Protein Response. *Cell* **107**, 827–830 (2001).
49. Back, S. H. *et al.* J. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods (San Diego, Calif.)* **35**, 395–416 (2005).
50. Yoshida, H. *et al.* XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress* **107**, 881–891 (2001).
51. Harding, H. P. *et al.* Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular cell* **6**, 1099–1108 (2000).
52. Haze, K. *et al.* Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell* **10**, 3787–3799 (1999).

53. Yoshida, H. *et al.* ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the cis-Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *Molecular and cellular biology* **20**, 6755–6767 (2000).
54. Yamamoto, K. *et al.* Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *Journal of biochemistry* **136**, 343–350 (2004).
55. Meusser, B. *et al.* ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology* **7**, 766–772 (2005).
56. Vembar, S. S. & Brodsky, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Review Molecular Cell Biology* **9**, 944–957 (2008).
57. Wiertz, E. *et al.* Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **432**–438 (1996).at <<http://med.stanford.edu/bogyolab/pdf/8945469.pdf>>
58. Matlack, K. E. *et al.* a Protein translocation: tunnel vision. *Cell* **92**, 381–90 (1998).
59. Mothes, W. Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *The EMBO journal* **13**, 3973–3982 (1994).
60. Schäfer, A. & Wolf, D. H. Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *The EMBO journal* **28**, 2874–2884 (2009).
61. Crawshaw, S. *et al.* The oligomeric state of Derlin-1 is modulated by endoplasmic reticulum stress. *Molecular Membrane Biology* **24**, 113–120 (2007).
62. Ye, Y. *et al.* A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**, 841–847 (2004).
63. Schrader, E. K. *et al.* Targeting proteins for degradation. *Nature chemical biology* **5**, 815–822 (2009).
64. Pickart, C. M. & Eddins, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* **1695**, 55–72 (2004).
65. Wei, L. & Ye, Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell and Molecular Life Science* **65**, 2397–2406 (2008).

66. Capilli, A. D. & Lima, C. D. Taking it Step by Step: Mechanistic insights from structural studies of ubiquitin/ubiquitin-like protein modification pathways. *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 726–735 (2007).
67. Pickart, C. M. & Fushman, D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current opinion in chemical biology* **8**, 610–6 (2004).
68. Xu, P. *et al.* Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**, 133–45 (2009).
69. Thrower, J. S. *et al.* Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal* **19**, 94–102 (2000).
70. Pickart, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry* **70**, 503–533 (2001).
71. Jung, T. *et al.* The proteasomal system. *Molecular aspects of medicine* **30**, 191–296 (2009).
72. Tanaka, K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **85**, 12–36 (2009).
73. Finley, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry* **78**, 477–513 (2009).
74. Deveraux, Q. *et al.* A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *The Journal of biological chemistry* **269**, 7059–61 (1994).
75. Kokame, K. *et al.* Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry* **275**, 32846–32853 (2000).
76. van Laar, T. *et al.* The novel MMS-inducible gene Mif1/KIAA0025 is a target of the unfolded protein response pathway. *FEBS letters* **469**, 123–131 (2000).
77. Hori, O. *et al.* Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **9**, 457–469 (2004).
78. Sai, X. *et al.* The ubiquitin-like domain of Herp is involved in Herp degradation, but not necessary for its enhancement of amyloid β -protein generation. *FEBS Letters* **553**, 151–156 (2003).
79. Kokame, K. *et al.* Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *The Journal of biological chemistry* **276**, 9199–9205 (2001).

80. Ma, Y. & Hendershot, L. M. Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. *The Journal of biological chemistry* **279**, 13792–13799 (2004).
81. Chan, S. L. *et al.* Herp stabilizes neuronal Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry* **279**, 28733–28743 (2004).
82. Chigurupati, S. *et al.* The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein counteracts calcium store depletion and induction of CCAAT enhancer-binding protein homologous protein in a neurotoxin model of Parkinson disease. *The Journal of biological chemistry* **284**, 18323–18333 (2009).
83. Li, H.-Y. *et al.* A redox-sensitive luciferase assay for determining the localization and topology of endoplasmic reticulum proteins. *PloS one* **7**, e35628 (2012).
84. Schulze, A. *et al.* The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *Journal of molecular biology* **354**, 1021–1027 (2005).
85. Kny, M. *et al.* Herp regulates HRD1-mediated ubiquitylation in a ubiquitin-like-domain-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* **286**, 5151–5156 (2010).
86. Carroll, S. M. & Hampton, R. Y. Usa1p is required for optimal function and regulation of the Hrd1p endoplasmic reticulum-associated degradation ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* **285**, 5146–5156 (2010).
87. Eura, Y. *et al.* Derlin-1 deficiency is embryonic lethal, Derlin-3 deficiency appears normal, and Herp deficiency is intolerant to glucose load and ischemia in mice. *PloS one* **7**, e34298 (2012).
88. Tuvia, S. *et al.* The ubiquitin E3 ligase POSH regulates calcium homeostasis through spatial control of Herp. *The Journal of cell biology* **177**, 51–61 (2007).
89. Miura, H. *et al.* Deletion of Herp facilitates degradation of cytosolic proteins. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **15**, 843–853 (2010).
90. Kim, T.-Y. *et al.* Herp enhances ER-associated protein degradation by recruiting ubiquilins. *Biochemical and biophysical research communications* **369**, 741–6 (2008).
91. Okuda-Shimizu, Y. & Hendershot, L. M. Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Molecular cell* **28**, 544–54 (2007).

92. Liang, G. *et al.* Polycystin-2 is regulated by endoplasmic reticulum-associated degradation. *Human molecular genetics* **17**, 1109–19 (2008).
93. Marutani, T. *et al.* ER-stress-inducible Herp, facilitates the degradation of immature nicastrin. *Biochimica et biophysica acta* **1810**, 790–800 (2011).
94. Macer, D. R. & Koch, G. L. Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science* **91 (Pt 1)**, 61–70 (1988).
95. Siegel, M. R. & Sisler, H. D. Inhibition of Protein Synthesis in Vitro by Cycloheximide. *Nature* **200**, 675–676 (1963).
96. Sobell, H. M. Actinomycin and DNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 5328–31 (1985).
97. Hidvegi, T. *et al.* The role of autophagy in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Methods in enzymology* **499**, 33–54 (2011).
98. Kamimoto, T. *et al.* Intracellular inclusions containing mutant alpha1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity. *The Journal of biological chemistry* **281**, 4467–4476 (2006).
99. Kruse, K. B. *et al.* Mutant fibrinogen cleared from the endoplasmic reticulum via endoplasmic reticulum-associated protein degradation and autophagy: an explanation for liver disease. *The American journal of pathology* **168**, 1299–1308 (2006).
100. Bae, E. *et al.* Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase “Synoviolin.” *EMBO Journal* **8111**, 113–122 (2007).
101. Maddocks, O. D. K. & Vousden, K. H. Metabolic regulation by p53. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **89**, 237–245 (2011).
102. Brooks, C. L. & Gu, W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Molecular cell* **21**, 307–15 (2006).
103. Dornan, D. *et al.* The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* **429**, 86–92 (2004).
104. Leng, R. P. *et al.* Pirh2, a p53-induced Ubiquitin-Protein Ligase Promotes p53 Degradation. *Cell* **112**, 779–791 (2003).
105. Crighton, D. *et al.* DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**, 121–134 (2006).

106. Bialik, S. & Kimchi, A. The Death-Associated Protein Kinases : Structure , Function , and Beyond. *Annual Review of Biochemistry* **75**, 189–210 (2006).
107. Maiuri, M. C. *et al.* Autophagy regulation by p53. *Current opinion in cell biology* **22**, 181–185 (2010).
108. Levine, B. & Abrams, J. p53: The Janus of Autophagy? *Nature Cell Biology* **10**, 637–639 (2008).
109. Tasdemir, E. *et al.* Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature Cell Biology* **10**, 676–687 (2008).
110. Maiuri, M. C. *et al.* Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 741–752 (2007).