



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“LOCALIZACIÓN SUBCELULAR E INTERACTOMA DE LA PROTEASA
TMPRSS11a, EN LINEAS CELULARES HUMANAS HEK293 Y A459”.**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

CHRISTIAN DANIEL FERNÁNDEZ CABRERA

MÓNICA CÁCERES LLUCH

Profesor Director

Programa de Biología Celular y
Molecular, ICBM

Facultad de Medicina

Universidad de Chile

ALFONSO PAREDES VARGAS

Profesor Patrocinante

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas

Universidad de Chile

Santiago – Chile

2019



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“LOCALIZACIÓN SUBCELULAR E INTERACTOMA DE LA PROTEASA
TMPRSS11a, EN LINEAS CELULARES HUMANAS HEK293 Y A459”.**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

CHRISTIAN DANIEL FERNÁNDEZ CABRERA

Profesor Director:

Dra. Mónica Cáceres Lluch

Comisión Evaluadora:

Dr. Alfonso Paredes Vargas

Dr. Sergio Lobos Camus

Dra. Valentina Parra Ortiz

Santiago – Chile

2019

AGRADECIMIENTOS

Antes que todo, quisiera agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a mi formación y desarrollo a lo largo de la carrera y durante el presente trabajo de tesis, en especial a la Dra. Mónica Cáceres, directora de esta investigación, por su paciencia, supervisión y por sobre todo por la confianza y todo lo que me enseñó y sigue enseñándome de este pequeño, pero a la vez enorme, mundo científico, quiero agradecer también al Dr. Oscar Cerda, por la gran disposición cuando tenía dudas o necesitaba ayuda. A ambos agradecer también las palabras de aliento y motivación a lo largo de estos años cuando llegue al laboratorio como un joven estudiante de 3er año de bioquímica. También agradecer a Don Nicanor Villarroel por su labor.

Por otro lado, quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, Diego Morales, por su inagotable paciencia cuando le hacía preguntas y por esas gratas charlas sobre el universo Marvel y Star Wars, armando teorías de lo que se venía en el futuro y a Andrés Burgos por esas charlas improvisadas y por el respeto por los TOC de orden. También, agradecer a OC Lab por las conversaciones de pasillo, en especial a Ian Silva por ese humor ácido característico. Además, quiero agradecer a mis amigos por el apoyo a lo largo de la carrera, los momentos de culto en clases, en la cancha, microclima, los pastos o en uno que otro concierto de *heavy* y por lo que aportaron en mi formación.

Finalmente quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi familia. A mis padres Juan Daniel Fernández y Maritza Cabrera, por sus constantes muestras de cariño, apoyo, motivación, constantes enseñanzas y por sobretodo por darme la libertad de elegir y enseñarme que siempre lo que haga, debe ser entregando el máximo, siendo feliz en lo que uno hace y porque esta memoria, esta tesis, esta carrera, es el fiel reflejo de ellos sacrificándose día a día desde el día cero de mi vida. A mi hermana, por enseñarme que por más dificultades que haya en el camino, siempre se puede hacer todo, con dedicación, esfuerzo y constancia. A mis abuelos por todo el amor entregado, el apoyo y la curiosidad por lo que hacía estando tantas horas en la U o en el laboratorio.

Mención especial a mi *partner in crime/love* de estos 6 años, de toda la carrera, gracias a la cual aprendí matemáticas y seguí vivo en la carrera, Mariely, por el inagotable apoyo y cariño durante estos años. Y por quererme tal cual soy.

En fin, una plana se hace poco para agradecer como corresponde a todas y cada una de las personas que influyo en mi crecimiento personal y académico, en especial a mi familia que sin ellos no soy nada, así que considerando eso, solo puedo decir: ¡ **Gracias Totales !**

FINANCIAMIENTO

Esta memoria de tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1181263 (M. Cáceres) y el Núcleo Milenio de Enfermedades Asociadas a Canales Iónicos (MiNICAD). Fue realizada en el Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

PUBLICACIONES CIENTIFICAS.

Saldías, MP*, Fernández, C*, Morgan, A., Díaz, C., Morales, D., Jaña, F., Gómez, A., Silva, A., Briceño, F., Oyarzún, A., Maldonado, F., Cerda, O., Smith, PC., Cáceres, M. (2017). **“Aged blood factors decrease cellular responses associated with delayed gingival wound repair”**. PloS one, 12(9), e0184189.

**Estos autores contribuyeron de igual forma al trabajo.*

Fernández, C., Folli, V., Morales, D., Saldías, MP., Ortiz, L., del Campo, A., Cerda, O., Cáceres, M. (*En revisión*). **“Young-blood serum ameliorated skin wound Healing in old rats increasing myofibroblast differentiation and decreasing senescence”**. Journal of Gerontology: Biological Sciences.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTIFICAS.

Fernández, C., Burgos, A., Morales, D., Martínez, D., Cáceres, M. **“New perspectives of Aging: Searching for new targets”**. International Perspectives on Geroscience, Puerto Varas, Chile, 18 al 21 de Noviembre de 2019.

Fernández, C., Burgos, A., Morales, D., Canelo, J., Saldías, MP., Cáceres, M. **“Molecular target related to aging involved in wound healing”**. International Perspectives on Geroscience, Puerto Varas, Chile, 18 al 21 de Noviembre de 2019.

Cáceres, M., Saldías, M., Fernández, C., Folli, V., Cerda, O. **“Young blood serum increased cellular response associated to wound healing in old rats”**. American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, 8 al 12 de Diciembre de 2018.

Cáceres, M., Morgan, A., Diaz, C., Silva, A., Saldias, MP., Fernández, C., Briceño, F., Cerda, O. **“Aged blood factors decrease cellular responses associated to gingival wound healing”**. American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, 3 al 7 de Diciembre de 2016.

Cáceres, M., Fernández, C., Saldias, MP., Folli, V., Cerda, O. **“Young soluble growth factors/cytokines improves wound healing in old rats”**. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, 2 al 6 de Abril de 2016.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDO	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE TABLAS	x
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	xi
1. RESUMEN	xiii
2. ABSTRACT	xiv
3. INTRODUCCIÓN	1
4. OBJETIVOS.....	8
4.1 Objetivo general.....	8
4.2 Objetivos específicos.....	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5.1 Cultivo celular.	9
5.2 Plásmidos y transfecciones	9
5.3 Anticuerpos.....	10
5.3.1 Anticuerpos primarios.....	10
5.3.2 Anticuerpos secundarios	10
5.4 Fraccionamiento celular.....	12

5.5 Fraccionamiento de Endosomas	14
5.6 Inmunoprecipitación con sistema Myc-Trap®_A	15
5.7 Electroforesis e Inmunoblot.	16
5.8 Inmunofluorescencia.....	17
5.9 Proximity Ligation Assay.....	18
5.10 Modelado computacional de la interacción de unión TM11a- α 5 β 1	20
6. RESULTADOS.....	22
6.1 Proteínas candidatas que interactúan con TMPRSS11a.....	22
6.2 Localización subcelular de TMPRSS11a.....	25
6.3 Interactoma asociado a TMPRSS11a.....	35
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIONES	44
9. PROYECCIONES.....	45
10. REFERENCIAS	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de proteínas moduladas durante el envejecimiento.....	4
Figura 2. Esquema de clasificación de las serinas proteasas ancladas a membrana plasmática.....	5
Figura 3. Ensayo de actividad SA-βGal.	7
Figura 4. Inmunoprecipitación de TMPRSS11a utilizando el sistema Myc-Trap®_A.	22
Figura 5. Distribución subcelular de las proteínas candidatas de interacción con TMPRSS11a.....	23
Figura 6. Microfotografías confocales de Inmunofluorescencia para TMPRSS11a con marcadores de Retículo endoplásmico, Golgi y Membrana plasmática.....	26
Figura 7. Análisis de intensidad de fluorescencia de TMPRSS11a con marcadores de organelo o estructura celular.....	27
Figura 8. Microfotografías confocales de Inmunofluorescencia para TMPRSS11a con marcador específico de Retículo endoplásmico.	29
Figura 9. Microfotografías confocales de Inmunofluorescencia para TMPRSS11a con proteínas de Retículo, Golgi y membrana plasmática.....	30
Figura 10. Fraccionamiento celular en células A549.....	32
Figura 11. Microfotografías confocales de Inmunofluorescencia para TMPRSS11a.....	33
Figura 12. Fraccionamiento de endosomas.	34

Figura 13. Ensayo de ligación proximal (PLA).	36
Figura 14. Secuencia aminoacídica de TMPRSS11a.	40
Figura 15. Modelado estructural del dominio catalítico de TMPRSS11a.	41
Figura 16. Acoplamiento molecular entre TMPRSS11a y ITG α 5 β 1.	42
Figura 17. Modelo propuesto para TMPRSS11a.	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia e Inmunoblot.	11
Tabla 2. Proteínas candidatas de interacción con un alto “coverage”.	24

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A549: *Human alveolar adenocarcinoma cell line*, línea celular de adenocarcinoma alveolar humano.

dH₂O: *Distilled water*, agua destilada.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, medio de cultivo celular.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ECRG1: *Esophageal cancer-related gene 1*, gen asociado a cáncer esofágico 1.

EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilendiaminotetraacético.

EEA1: *Early Endosome Antigen 1*, antígeno de endosomas tempranos.

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*, proteína fluorescente verde mejorada.

ERp57: *Endoplasmic Reticulum protein 57*, proteína del retículo endoplásmico 57.

ESCC: *Esophageal squamous cell carcinoma*, carcinoma esofágico de células escamosas.

FAK: *Focal Adhesion Kinase*, kinasa de adhesiones focales.

FLAG: denominación comercial del epítipo DYKDDDDK.

g: Aceleración gravitacional.

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GRP78: *Glucose-Regulated Protein, 78kD*, proteína regulada por glucosa de 78 kDa.

HEK293: *Human embryonic kidney cells 293*, células embrionarias de riñón humano 293.

HRP: *Horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante.

IB: Inmunoblot

IF: Inmunofluorescencia.

IL-6: *Interleukin 6*, interleucina 6.

KCl: Potassium chloride, cloruro de potasio.

kDa: Kilodalton

KH₂PO₄: *Potassium dihydrogen phosphate*, fosfato monopotásico.

LC-MS/MS: *Liquid chromatography-mass spectrometry*, espectrometría de masa acoplada a cromatografía líquida.

mAb: Anticuerpo monoclonal

mTOR: *mammalian Target of Rapamycin*, blanco de rapamicina en células de mamífero.

Na₂HPO₄: *Disodium hydrogen phosphate*, fosfato disódico.

Na₃VO₄: *Sodium orthovanadate*, ortovanadato de sodio.

NaCl: *Sodium Chloride*, cloruro de sodio.

NaF: *Sodium fluoride*, fluoruro de sodio.

NF-κB: *Nuclear Factor-kappa B*, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NP-40: *Nonyl phenoxypolyethoxylethanol*.

pAb: Anticuerpo policlonal

PBS: *Phosphate Buffered Saline*, amortiguador fosfato salino.

PFA: *Paraformaldehyde*, paraformaldehído

PIC: *Protein Inhibitor Cocktail*, inhibidores de proteasas.

PLA: *Proximity Ligation Assay*, ensayo de ligación proximal.

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*, fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PNS: *Post-Nuclear Supernatant*, sobrenadante post nuclear.

Rab5: *Ras-related protein Rab-5*, proteína relacionada con Ras.

Rab7: *Ras-related protein Rab-7*, proteína relacionada con Ras.

RSB: *Reducing Sample Buffer*, amortiguador de carga para electroforesis de proteínas.

SASP: *Senescence-Associated Secretory Phenotype*, fenotipo secretor asociado a senescencia.

SA- β GAL: *senescence-associated β -galactosidase*, beta galactosidasa asociada a senescencia.

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*, dodecil sulfato de sodio.

SDS-PAGE: *SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

SFB: *Suero Fetal Bovino*.

TBST: *Tris-buffered saline -Tween*, solución salina tamponada con Tris-HCl, que contiene Tween 20.

TMPRSS11a: *Transmembrane protease serine, subfamily 11a*, serina proteasa transmembrana subfamilia 11a.

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor Alpha*, Factor de necrosis tumoral.

Tritón X-100: *Nonil Fenoxipolietoxietanol*.

TTSP: *type II transmembrane serine proteases*, serina proteasas de transmembrana tipo II.

Tween 20: Monolaurato de polietilén sorbitano.

UPR: *Unfolding Protein Response*, respuesta a proteínas mal plegadas.

WGA: *Wheat Germ Agglutinin*, aglutinina de germen de trigo.

1. RESUMEN “LOCALIZACIÓN SUBCELULAR E INTERACTOMA DE LA PROTEASA TMPRSS11a, EN LINEAS CELULARES HUMANAS HEK293 Y A459”

El envejecimiento es un proceso biológico gradual que se caracteriza por la disminución o cese de algunas funciones celulares. Este proceso se caracteriza por una acumulación de células senescentes, las cuales experimentan una pérdida de la capacidad proliferativa y la expresión de un fenotipo asociado a la senescencia. Las células senescentes presentan una expresión diferencial de proteínas, donde algunas disminuyen su expresión, mientras que otras aumentan. Investigaciones recientes permitieron describir en un modelo de células tumorales a la proteína TMPRSS11a, una serin-proteasa de membrana tipo II, de la cual aún se desconoce su ubicación y función dentro de la célula, pero en este modelo se ha relacionado con la inducción de senescencia celular. En este trabajo mediante diversas técnicas, tanto bioquímicas, proteómicas como celulares, encontramos que TMPRSS11a se localiza tanto en membrana plasmática como en retículo endoplásmico y endosomas tempranos. Además, mediante ensayo PLA, TMPRSS11a interactúa de forma física con Calnexina, una proteína residente del retículo involucrada directamente en un proceso de suma relevancia celular; el plegamiento de proteínas.

2. ABSTRACT “SUBCELLULAR LOCATION AND INTERACTOMA OF THE TMPRSS11a PROTEASA, IN HUMAN CELLULAR LINES HEK293 AND A459”

Aging is a gradual biological process characterized by the decrease of some cellular functions. This process is characterized by an accumulation of senescent cells, which experience a diminished of proliferative capacity and the expression of a phenotype associated with senescence. Senescent cells have a differential expression of proteins. Recent research allowed to describe in a tumor cell model the protein TMPRSS11a, a type II membrane serine protease is increased during aging and its location and function within the cell is still unknown, but in this model overexpression has been related to induction of cellular senescence. In this work, using biochemical, proteomic and cellular techniques, we found that TMPRSS11a is located both in the plasma membrane and in the endoplasmic reticulum and early endosomes. In addition, by proximity ligation assay, TMPRSS11a physically interacts with Calnexin, a reticulum resident protein directly involved in a process of utmost cellular relevance; protein folding.

3. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso biológico gradual caracterizado por una disminución de las funciones tanto a nivel celular como del organismo, con serias implicancias a nivel de la calidad de vida del individuo y de la salud pública (Smith *et al.*, 2015; Kennedy *et al.*, 2014). Mas aún, la población de individuos mayor a 60 años crece más rápido que cualquier otro grupo etario; para el año 2050, la cantidad de personas mayores a 60 años se estima que será 5 veces mayor que la existente en el año 1950 (Fontana *et al.*, 2014). Es por esto, que el estudio de los mecanismos involucrados en el envejecimiento constituye un asunto de tremenda importancia para la salud pública.

El envejecimiento se caracteriza por una acumulación de células senescentes y un aumento basal de la inflamación (Lopez-Otin *et al.*, 2013). Estas características, a menudo se señalan como las responsables de la incidencia de patologías en individuos envejecidos, como el Alzheimer, osteoartritis, sarcopenia, fibrosis cardiaca y pancreática y una cicatrización de heridas defectuosa (Muñoz-Espín *et al.*, 2014). Por otro lado, el aumento de la senescencia celular ha sido descrito como un importante mecanismo evolutivo para evitar la proliferación de células cancerígenas (Rodier *et al.*, 2011); esto debido a que la senescencia celular es un proceso en el cual las células pierden su habilidad para proliferar (Contrepois *et al.*, 2017; Childs *et al.*, 2015). No obstante, durante el envejecimiento, estas células senescentes se acumulan en

los tejidos hasta llegar a ser entre 1 y el 15% del total de células (Campisi *et al.*, 2007), siendo el principal problema de esta acumulación, el hecho de que estas células al estar fuera del ciclo proliferativo, ocupan nichos celulares claves y producen citoquinas pro inflamatorias, las cuales afectan el desempeño del resto de células y por ende contribuyen al desarrollo de patologías relacionadas al envejecimiento (He & Sharpless, 2017).

Las células senescentes presentan un arresto del ciclo celular, un aumento de la expresión de la proteína p16^{INK4a}, cambios morfológicos y la expresión de la enzima beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA-βGal) (Rodier *et al.*, 2011). Además, estas células senescentes secretan una gran variedad de factores solubles que incluyen citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y proteasas; conocidos como fenotipo secretor asociado a senescencia (*SASP* por sus siglas en inglés) (Childs *et al.*, 2015). Una aproximación muy promisoriosa para disminuir los efectos nocivos de la senescencia celular era controlar el *SASP*; mediante diversas estrategias se modularon blancos como *TNF-α*, *mTOR*, *NF-κB*, *IL-6*, entre otros. Sin embargo, el éxito de estas estrategias fue limitado. Para demostrar el efecto deletéreo de estas células senescentes (efecto senolítico), se utilizaron animales con una delección inducible de p16^{INK4a}, en donde se redujo el desarrollo de cataratas y sarcopenia en un modelo murino de envejecimiento prematuro (Baker *et al.*, 2011).

Debido a lo anterior es que nuestro laboratorio se enfoca en encontrar nuevos blancos terapéuticos que puedan ser modulados durante el envejecimiento para de esta forma, mejorar procesos vitales como la reparación de heridas.

En este contexto es que utilizamos una estrategia de análisis proteómico basado en espectrometría de masa, con el fin de comparar el perfil de expresión proteico en muestras de fibroblastos de ratas jóvenes y envejecidas (2 y 18 meses, respectivamente) con el fin de identificar nuevos candidatos relacionados con el envejecimiento. En este estudio identificamos alrededor de 500 proteínas sobre expresadas diferencialmente en fibroblastos jóvenes o viejos. Dentro de estas proteínas, encontramos diversos candidatos que podrían estar involucrados en el envejecimiento, incluyendo proteínas pertenecientes al metabolismo mitocondrial, receptores de membrana, canales iónicos, componentes del remodelado de matriz extracelular, proteínas de señalización celular, inflamación y asociadas directamente al envejecimiento (*Figura 1A*). Interesantemente, destacamos una proteína que se encontraba sobre expresada únicamente en muestras de rata envejecida y que su función es relevante en la inducción de senescencia: **Serina proteasa de transmembrana 11a (Transmembrane protease serine 11a, TMPRSS11a)**

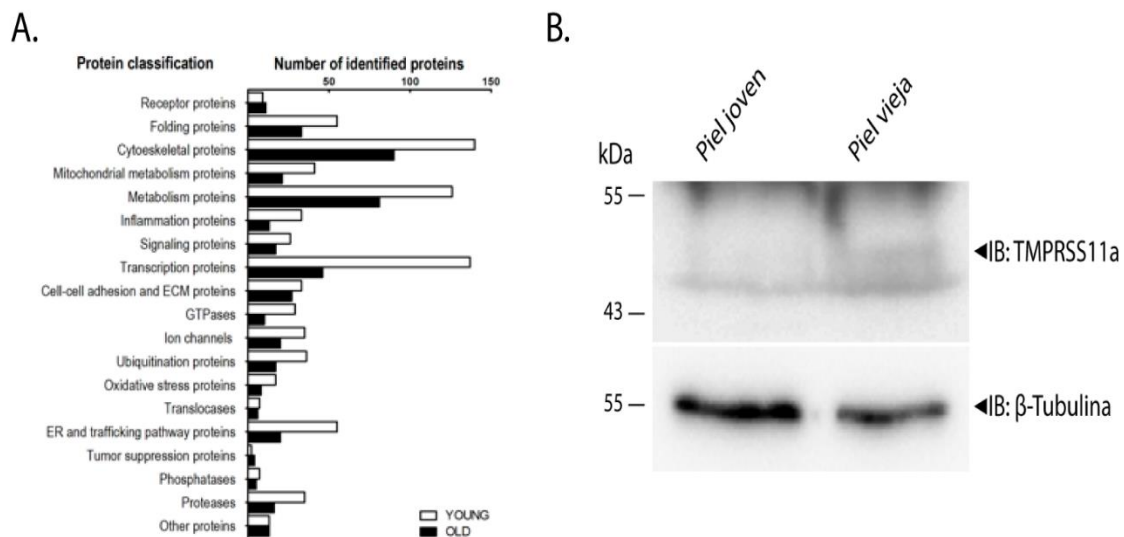


Figura 1. Clasificación de proteínas moduladas durante el envejecimiento.

(A) Clasificación de proteínas putativas relacionadas al envejecimiento. Encontramos 589 y 582 proteínas sobreexpresadas en fibroblastos de rata joven y vieja, respectivamente. **(B)** Inmunoblot para TMPRSS11a en homogenizado de piel proveniente de rata joven y vieja, como control de carga se utilizó β -tubulina. Cabeza de flecha indica presencia de banda de TMPRSS11a y de β -tubulina (Resultado preliminar Laboratorio de envejecimiento y reparación. Christian Fernández).

TMPRSS11a (también conocida como TM11a, o bien, ECRG1, HATL1 o HESP, debido al gen que la codifica, el cual se encuentra en el cromosoma número 4), pertenece a las serinas proteasas de tipo II (*TTSP*, por sus siglas en ingles), la cual corresponde a una familia de serinas proteasas ancladas a membrana (Sales *et al.*, 2011; Netzel-Arnett *et al.*, 2003). Varios miembros de la familia TTSP, han sido encontrados ampliamente desregulados durante el desarrollo de tumores y favoreciendo su progresión; esto producto de su rol proteolítico a nivel peri- celular y su participación en reordenamientos dinámicos de las interacciones célula-célula, célula-matriz (Antalis *et al.*, 2010) (Figura 2). El ratón Knock out para esta proteasa (TMPRSS11a^{-/-}) es viable y no presenta

alteraciones a nivel histológico ni en el desarrollo embrionario, la salud o la esperanza de vida (Sales 2011). No obstante, la función de esta proteína en diversos procesos celulares se desconoce aún, así como también su localización e interactoma a nivel celular.

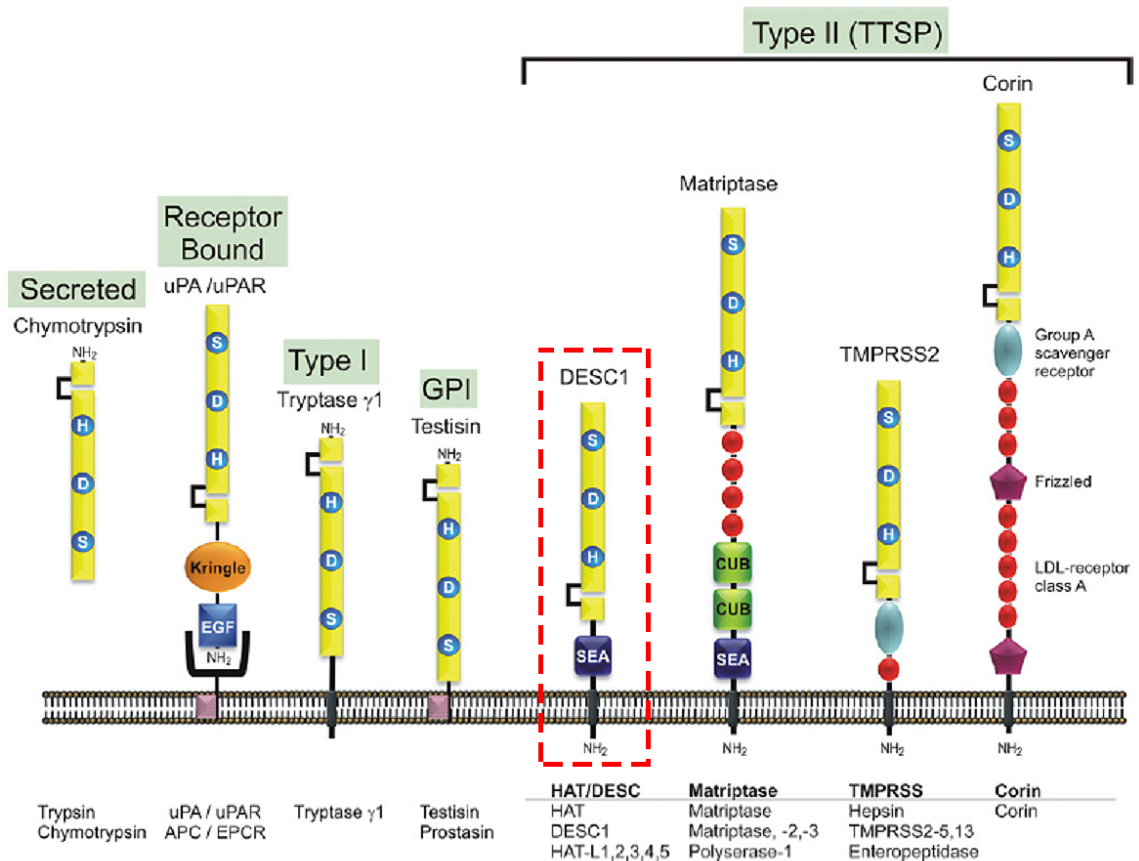


Figura 2. Esquema de clasificación de las serinas proteasas ancladas a membrana plasmática.

Diversas serina proteasas de membrana han sido descritas y agrupadas en familias de acuerdo con su disposición en la membrana y a los dominios que presentan, en el caso de TMPRSS11a, pertenece a la familia TTSP, subfamilia HAT/DESC. En un recuadro rojo se señala la subfamilia a la que pertenece TMPRSS11a. Figura adaptada de Antalis, 2010. "The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment".

Interesantemente, TMPRSS11a presenta una menor expresión en diversas células tumorales y tejidos adyacentes, especialmente en carcinoma esofágico de células escamosas (ESCC, por sus siglas en inglés) (Rasool *et al.*, 2013). Además, la sobreexpresión de esta proteína induce la activación de un programa senescente en fibroblastos de la línea celular NIH3T3 (Zhao *et al.*, 2006). TMPRSS11a inhibe el crecimiento celular e induce arresto del ciclo celular en fase G1, mediado por p15^{INK4b} (Zhao *et al.*, 2004).

Datos de nuestro laboratorio, muestran que la expresión de TMPRSS11a en muestras de homogeneizados de piel aumenta en muestras provenientes de rata envejecida (18 meses) en comparación con la joven (2 meses) (*Figura 1B*). Por otro lado, la sobreexpresión de TMPRSS11a induce un aumento significativo de la expresión de la enzima SA-βGal en modelo de células HEK293 (*Figura 3*), lo que corrobora lo descrito por Zhao y cols (2006). Además, la sobreexpresión de TMPRSS11a está acompañada de un aumento de la fosforilación de la histona H2A.X (asociada al daño en el ADN), la cual es un marcador descrito de células senescentes.

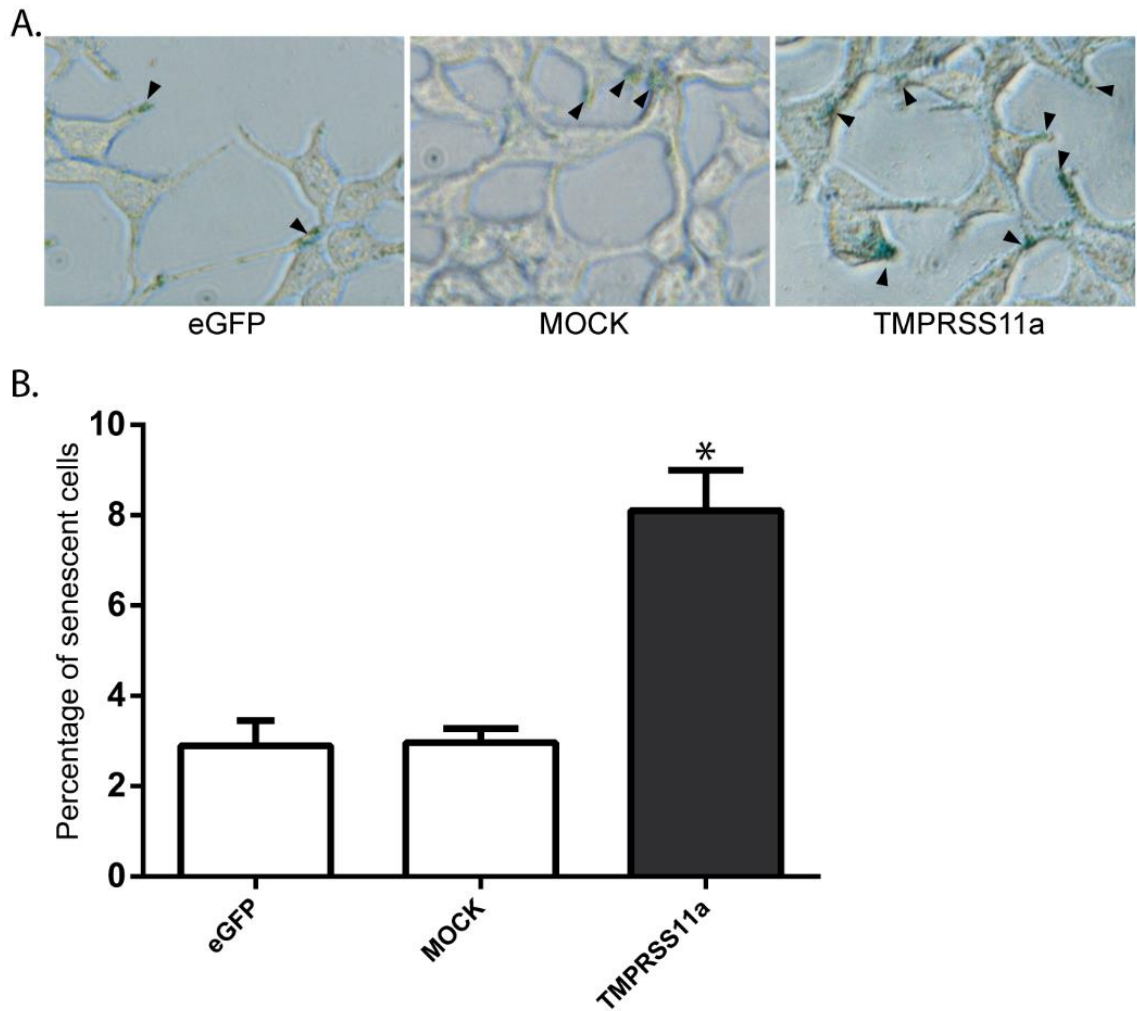


Figura 3. Ensayo de actividad SA-βGal.

(A) Microfotografía de células HEK293 transfectadas con eGFP, Vector vacío (mock) y TMPRSS11a. (B) Gráfico muestra cuantificación del porcentaje de células positivas para SA-βGAL. N=3. * indica diferencias significativas control vs TMPRSS11a $p < 0,05$. Resultado preliminar Laboratorio de envejecimiento y reparación tisular, Christian Fernández.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la localización subcelular de TMPRSS11a y su interacción con otras proteínas.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar proteínas candidatas que interactúan con TMPRSS11a utilizando una aproximación proteómica basada en el análisis mediante espectrometría de masa.
2. Determinar la localización celular de la serin proteasa TMPRSS11a en modelo de células de carcinoma pulmonar A549 y en sistema de expresión heterólogo HEK293.
3. Validar la interacción entre TMPRSS11a y proteínas candidatas mediante ensayo de ligación proximal ("Proximity Ligation Assay", PLA).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo celular.

Células de riñón humano embrionario HEK293 se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂, en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (Gibco, Life Technologies, Cat #: 12100-046), suplementado con 1% p/v penicilina/estreptomicina (Gibco, Life Technologies, Cat #: 15140-122) y 10% v/v de SFB (Biowest, Cat #: S1810). Células de carcinoma epitelial de pulmón A549 se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂, en medio DMEM alto en glucosa (Gibco, Life Technologies, Cat #: 12100-046), suplementado con 1% p/v penicilina/estreptomicina (Gibco, Life Technologies, Cat #: 15140-122) y 10% v/v de SFB (Biowest, Cat #: S1810). Para su almacenaje, las células se suspendieron en medio de congelación que contiene 90% SFB y DMSO al 10% como criopreservante, y se depositaron en criotubos para su posterior congelación a -80 °C mediante un descenso gradual de la temperatura.

5.2 Plásmidos y transfecciones

El plásmido codificante para la proteína Tmprss11a (humana, isoforma 1, 421 aas) fue adquirido en OriGene (Myc-DDK-tagged; Origene, Cat #: RC221395). El plásmido codificante para la mutante activa de Rab5 (GFP-Rab5CA (Q79L); Addgene Cat #: 35140) fue donado gentilmente por el Dr. Vicente Torres. Los plásmidos codificantes para el marcador de retículo (KDEL-RFP) y para el marcador del aparato de Golgi (mCherry-Golgi-7) fueron

gentilmente donados por el Dr. Oscar Cerda (Addgene, Cat #: 114177 y Cat #: 55052, respectivamente). El plásmido codificante para el marcador de retículo endoplásmico *pCytERM_mScarlet-i_N1* (Addgene, Cat #: 85068) fue adquirido directamente en Addgene. Como control de transfección de los plásmidos antes mencionados, se utilizó un plásmido codificante para la proteína fluorescente verde pEGFP-N1 (Clontech, Cat #: U55762) en el caso de los experimentos de localización; mientras que para el resto de los experimentos se utilizó un plásmido pcDNA™4/TO (Invitrogen, Cat #: V102020).

Tanto células HEK293, como A549 fueron transfectadas usando *Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen, Cat #: 11668019) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los cultivos fueron utilizados a las 72 horas post transfección.

5.3 Anticuerpos.

5.3.1 Anticuerpos primarios

Los anticuerpos utilizados durante el trabajo de tesis se encuentran debidamente detallados en la *Tabla 1*.

5.3.2 Anticuerpos secundarios

Anticuerpo policlonal anti IgG de ratón (H+L), conjugado a HRP producido en cabra (1/8000, KPL, Cat #: 074-1806); anticuerpo policlonal anti IgG de conejo (H+L), conjugado a HRP, producido en cabra (1/8000, KPL, Cat #: 074-1506);

anticuerpo policlonal anti IgG de rata (H+L), conjugado a HRP, producido en conejo (1/8000, OriGene, Cat#: TA130038). Anticuerpo policlonal anti IgG de conejo (H+L), conjugado a Alexa Fluor 488, producido en cabra (1/1000, Life Technologies, Cat #: A-11034); anticuerpo policlonal anti IgG₁ de ratón, conjugado a Alexa Fluor 488, producido en cabra (1/1000, Life Technologies, Cat #: A-21121); anticuerpo policlonal anti IgG_{2a} de ratón, conjugado a Alexa Fluor 555, producido en cabra (1/1000, Life Technologies, Cat #: A-21137); anticuerpo policlonal anti IgG₁ de ratón, conjugado a Alexa Fluor 594, producido en cabra (1/1000, Life Technologies, Cat #: A-21125). Finalmente, se utilizó Aglutinina de germen de trigo (WGA, por sus siglas en inglés) conjugada a Alexa Fluor 350 (1/1000, Life Technologies, Cat #: W11263).

Anticuerpo	Isotipo	Stock	Dilución	Tipo	Marca	Número de Catálogo
TMPRSS11a	rabbit IgG	1,8 mg/mL	IB: 1/500 IF: 1/100	pAb	ThermoFisher Scientific	PA5-50810
FLAG® M2	mouse IgG1	1,0 mg/mL	IB: 1/1000 IF: 1/100	mAb	Sigma-Aldrich	F1804
Golgin 97	mouse IgG1	0,2 mg/mL	IF: 1/100	mAb	Santa Cruz Biotechnology, INC	SC-59820
Calnexin	mouse IgG2a	0,2 mg/mL	IB: 1/1000 IF: 1/100	mAb	Santa Cruz Biotechnology, INC	SC-46669
Lamin A	mouse IgG2b	0,2 mg/mL	IB: 1/500	mAb	Santa Cruz Biotechnology, INC	SC-518013
GRP78	rat IgG	0,2 mg/mL	IB: 1/1000	mAb	Santa Cruz Biotechnology, INC	SC-13539
GAPDH	mouse IgG1	0,2 mg/mL	IB: 1/1000	mAb	Santa Cruz Biotechnology, INC	SC-47724
Rab7	mouse IgG1	0,2 mg/mL	IB: 1/500	mAb	Santa Cruz Biotechnology, INC	SC-376363
EEA1	mouse IgG1	0,2 mg/mL	IB: 1/500 IF: 1/50	mAb	Santa Cruz Biotechnology, INC	SC-137130
Rab5	mouse IgG2b	0,2 mg/mL	IB: 1/500 IF: 1/50	mAb	Santa Cruz Biotechnology, INC	SC-46692
Integrina β1	Mouse IgG1	0,2 mg/mL	IB: 1/500	mAb	Santa Cruz Biotechnology, INC	SC-59827

Tabla 1. Descripción anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia e Inmunoblot.

5.4 Fraccionamiento celular.

Células A549 fueron lavadas con amortiguador fosfato salino PBS (2,67 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 137,93 mM NaCl; 8,06 mM Na₂HPO₄-7H₂O; pH 7,4) frío y luego a cada placa se le añadió 1 mL de PBS frío para proceder a raspar cuidadosamente las células, la suspensión obtenida se transfirió a un tubo de centrifuga de 1,5 mL enfriado previamente. La suspensión celular se centrifuga a 11.000 x g durante 10 segundos a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 900 µL de solución PBS/ 0,1% de NP-40 (Nonyl Phenoxyethoxyethanol) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa (5 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 0,1 µg/µL PMSF; PIC 1x Cytoskeleton, INC Cat #: PIC02). La suspensión se incubó durante 10 minutos a 4°C procurando resuspender vigorosamente cada 2 minutos. Posterior al tiempo de incubación, se recuperó una porción de 100 µL (porción de lisado completo) y el remanente se sometió a una centrifugación de 11.000 x g durante 10 segundos a una temperatura de 4°C.

El sobrenadante se transfiere a un tubo de centrifuga y se conserva a 4°C para continuar el protocolo; el sedimento se resuspendió en amortiguador STM (250 mM Sucrose; 50 mM Tris-HCl pH 7.4 y 5 mM MgCl₂; además de inhibidores de proteasas y fosfatasa) y se centrifugó a 500 x g por 15 minutos. El sobrenadante obtenido se descartó y el sedimento (fracción enriquecida en núcleos celulares) fue resuspendido en 100 µL de amortiguador NET (20 mM

HEPES pH 7.9; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 M NaCl; 0,2 mM EDTA; 20% Glicerol y 1% Tritón X-100; además de inhibidores de proteasas y fosfatasa).

El sobrenadante que fue almacenado a 4°C se sometió a una centrifugación de 15.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sedimento (fracción enriquecida en mitocondrias, peroxisomas y lisosomas) fue resuspendida en 100 µL de amortiguador SOL (50 mM Tris-HCl pH 6.8; 1 mM EDTA y 0,5% Tritón X-100; suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa), mientras que el sobrenadante fue transferido a un tubo de ultracentrífuga de 1,5 mL. Luego de balancear las muestras con PBS, se realizó una ultra centrifugación a 100.000 x g durante 60 minutos a 4°C; posterior a esto, el sedimento (fracción enriquecida en microsomas) se resuspendió en 100 µL de amortiguador NET. Por otro lado, el sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrífuga de 1,5 mL para nuevamente centrifugarlo a 200.000 x g durante 120 minutos. Finalmente, el sedimento (fracción enriquecida en ribosomas) se resuspendió en 100 µL de amortiguador STM, en tanto, el sobrenadante (fracción citosólica) se transfirió a un nuevo tubo de centrifuga de 1,5 mL.

Cada fracción se preparó adicionando 1/5 del volumen final de amortiguador Reducing Sample Buffer (RSB) (60 mM Tris-HCl pH 6.8; 25 % v/v glicerol; 2 % p/v SDS (Sigma-Aldrich, L5750); 14,4 mM 2-mercaptoetanol y 0,1 % p/v Azul Bromofenol) y se llevó a una posterior sonicación de 3 ciclos de 10 segundos cada uno, teniendo la precaución de mantener las muestras en hielo.

Finalmente, todas las muestras se incubaron a 90°C por 5 minutos en un termobloque.

5.5 Fraccionamiento de Endosomas

Células de la línea A549 fueron sembradas en placas de 10 cm por 24 horas en DMEM 10% SFB. Fueron debidamente lavadas con PBS y luego fueron soltadas cuidadosamente de la placa de forma mecánica con una espátula. Se centrifugaron a 1500 rpm a 4°C por 5 minutos. Las células luego fueron lavadas con 10 mL de PBS frío y centrifugadas a 1.700 x *g* a 4°C por 5 minutos y finalmente fueron resuspendidas en amortiguador de homogenización (250 mM Sacarosa; 1 mM EDTA; 3 mM Imidazol; pH 7.4), centrifugadas a 2.000 x *g* a 4°C por 10 minutos. El sedimento celular fue resuspendido en 500 µL de amortiguador de homogenización que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasas y homogenizado mediante 8 pasajes a través de una aguja de 22G en una jeringa de 1 mL (NIPRO Medical Corp.). El sobrenadante Postnuclear (PNS) se obtuvo centrifugando el homogenizado 10 minutos a 3.000 x *g* a 4°C. Posteriormente el PNS se llevó a una solución de sacarosa al 40.6%, mezclando 400 µL de PNS con 600 µL de solución de sacarosa al 60% en amortiguador de homogenización. El gradiente de densidades fue preparado, utilizando 1 mL de homogenizado (Sacarosa 40.6%), 2 mL de Sacarosa al 35%, 1,5 mL de Sacarosa al 30% y 0,4 mL de amortiguador de homogenización (Sacarosa 8%) en un tubo de ultra centrifugación (Sorvall™ WX+

Ultracentrifugation Series). El gradiente fue centrifugado a 125.000 x *g* por 66 minutos a 4°C. Las fracciones de endosomas fueron las siguientes; endosomas tempranos en la interfase 30/35% y endosomas tardíos en la interfase 8/30%. Para el análisis de proteínas, las fracciones fueron mezcladas con amortiguador RSB y cargados en un gel de SDS-PAGE 10% (Torres *et al.*, 2008).

5.6 Inmunoprecipitación con sistema Myc-Trap®_A

Las células fueron lavadas con PBS (2,67 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 137,93 mM NaCl; 8,06 mM Na₂HPO₄·7H₂O; pH 7,4) frío y luego a cada placa se le añadió 1 mL de PBS frío para raspar las células cuidadosamente, posteriormente la suspensión celular fue transferida a un tubo de centrifuga de 1,5 mL previamente enfriado. Enseguida esta suspensión fue centrifugada a 500 rcf por 3 minutos a una temperatura de 4°C, el sedimento se descartó y se realizaron 2 lavados con PBS frío y resuspendiendo suavemente el sedimento.

El sedimento se resuspendió en 200 µL de amortiguador de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,5% NP-40; 5 mM NaF; 1 mM PMSF; 1 mM Na₃VO₄; PIC 1X y dH₂O) frío y se incubó en hielo por 30 minutos con resuspensiones prolíficas cada 10 minutos. Seguido de esto, el lisado se centrifuga a 11.000 x *g* por 15 minutos a 4°C, luego el sobrenadante se transfiere a otro tubo de centrifuga y se le añadieron 300 µL del amortiguador de dilución (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA y dH₂O); el

sedimento se descarta. A partir de este lisado diluido, se tomaron 50 μL y se les añadió 1/5 del volumen final de amortiguador RSB para preparar el INPUT.

Las “beads” Myc-Trap[®]_A fueron resuspendidas utilizando un vortex y luego se tomaron 25 μL de la suspensión y se diluyeron en 500 μL de amortiguador de dilución frío y se centrifugan a 2.500 x g por 2 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se repitió el procedimiento de centrifugación 2 veces para lavar las “beads”. Una vez equilibradas las “beads”, se resuspendieron con el lisado diluido y se incubaron en agitación rotacional por 1 hora a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, el lisado se centrifugo a 2.500 x g por 2 minutos a 4°C. Del sobrenadante obtenido se recuperaron 50 μL y se mezclaron con 1/5 del volumen final de RSB y el remanente se descartó. Las “beads” se resuspendieron con 500 μL de amortiguador de dilución frío y se centrifugaron a 2.500 x g por 2 minutos a 4°C; este procedimiento se realizó 3 veces para lavar los complejos. Finalmente, las “beads” se resuspendieron en 100 μL de amortiguador de carga RSB. Todas las muestras se incubaron a 90°C por 5 minutos en un termobloque.

5.7 Electroforesis e Inmunoblot.

Las muestras obtenidas a partir de las distintas técnicas se resolvieron en geles de poliacrilamida con Dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE) al 12 % p/v (salvo las muestras de fraccionamiento de endosomas), a un potencial eléctrico constante de 60 V en el gel concentrador y 70 V en el gel separador. Las

proteínas separadas en el gel de acrilamida se transfirieron electroforéticamente a una membrana *Immun-Blot PVDF Membrane* de 0,2 μm de tamaño de poro (Bio-Rad, Cat #: 1620177), por transferencia húmeda en un sistema *Mini Trans-Blot® cell* (Bio-Rad, Cat #: 1703930) a 20 V por 16 horas. Luego de la transferencia, la membrana se agita por 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo, o Blotto, que contiene 4 % p/v de leche descremada disuelta en TBST (Solución salina compuesta por 10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl y 0,1 % v/v Tween 20).

La incubación con anticuerpos primarios se realizó durante 16 horas a 4 °C, o durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados de 10 minutos con TBST, la membrana se vuelve a incubar con anticuerpo secundario conjugado a una peroxidasa de rábano picante (HRP), en TBST, por 1 hora a temperatura ambiente. Después de los últimos 3 lavados de 10 minutos con TBST, se incuba la membrana con un sustrato quimio luminiscente de HRP; *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific™, Cat #:34580) y se detectó la actividad enzimática de HRP mediante el uso de un foto documentador Alliance Mini HD9 (Uvitec).

5.8 Inmunofluorescencia.

Las células sembradas en cubreobjetos de 12 mm se fijaron con Formaldehido al 4% y luego se incubaron con una solución de bloqueo (Tritón X-100 al 0,1% v/v y leche descremada al 4% p/v, disueltos en PBS) durante 60 minutos a

temperatura ambiente. Estas células se incubaron con anticuerpo primario anti TMPRSS11a, anticuerpo primario anti FLAG, anticuerpo primario anti Calnexina, anticuerpo primario anti Golgina 97; en una cámara húmeda, por 3 horas a temperatura ambiente, y luego se hicieron 3 lavados de 10 minutos con solución de PBS. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario (1/1000 v/v) y la tinción WGA (1/1000 v/v) en una cámara húmeda, por 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, las células se lavaron 4 veces con PBS. Para el marcaje nuclear, se incubaron con Hoechst (1/5000 v/v, Invitrogen, Cat #: 62249) durante 10 minutos. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos, con reactivo de montaje Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich, Cat #: F4680). Y al terminar fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia (Confocal *Carl Zeiss Inverted Axio Observer 7 LSM 800* [Facility USACH] y *Carl Zeiss Inverted Axio Observer 5*).

5.9 Proximity Ligation Assay (Life Technologies Cat #: DUO92101-1KT)

Las células fueron sembradas en cubreobjetos de 12 mm y fijadas con Formaldehído al 4% durante 10 minutos, seguido de 2 lavados con PBS.

Las células fueron permeabilizadas utilizando una solución de Triton-X100 al 0,1% en PBS, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, para bloquear las uniones inespecíficas se utilizó *Duolink® Blocking Solution*, y se realizó una incubación por 60 minutos en cámara húmeda a 37°C.

Transcurrido el tiempo, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios anti-TMPRSS11a y anti-Calnexina, los cuales fueron diluidos en *Duolink® Antibody Diluent*, utilizando una concentración de 1/100 y 1/50 respectivamente. Esta incubación se realizó por 120 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Luego, se llevaron a cabo 2 lavados con 1x *Wash Buffer A* por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de la incubación con las sondas *PLUS and MINUS PLA probes*, diluidas 1/5 en *Duolink® Antibody Diluent*. La incubación se llevó a cabo en una cámara húmeda por 60 minutos a 37°C.

Una vez incubadas las sondas, las células fueron lavadas 2 veces con 1x *Wash Buffer A*, para luego llevar a cabo el proceso de ligación, utilizando la enzima Ligasa (suministrada por el kit), disuelta en 5x *Duolink® Ligation buffer*. El procedimiento se realizó en una cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C. Inmediatamente fueron lavadas con 1x *Wash Buffer A*, e incubadas con la enzima Polimerasa (suministrada por el kit), diluida en 5x *Amplification buffer*, en cámara húmeda por 100 minutos a 37°C.

Finalmente, y teniendo precaución con la luz, las células fueron lavadas 2 veces con 1x *Wash Buffer B* por 10 minutos, seguido de un lavado con 0,01x *Wash Buffer B* por 1 minuto. Luego, los cubreobjetos fueron montados en un portaobjetos utilizando *Duolink® In Situ Mounting Media with DAPI* y sellados con una solución de esmalte. Las muestras fueron visualizadas y fotografiadas

con un microscopio invertido de fluorescencia (Confocal *Carl Zeiss Inverted Axio Observer 7 LSM 800* [Facility USACH] y *Carl Zeiss Inverted Axio Observer 5*).

5.10 Modelado computacional de la interacción de unión TM11a- $\alpha 5\beta 1$

Para evaluar la asociación entre TM11a y las subunidades de heterodímero de integrina $\alpha 1\beta 5$, se construyó inicialmente un modelo estructural de TM11a. La estructura cristalina TM11e (PDB Access code #: 2OQ5) se utilizó como plantilla, exhibiendo aproximadamente el 56% de identidad de secuencia aminoacídica con TM11a. Se generó un total de 2,000 modelos con Modeller (University of California San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA) y se seleccionó el mejor modelo con el valor de energía Molpdf más bajo y el puntaje Procheck (EMBL-EBI, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK) más alto. Para realizar los cálculos de acoplamiento proteína-proteína se utilizó la conformación activa de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (PDB Access code #: 3VI4). La región de unión para el acoplamiento se definió como un conjunto de residuos dentro de 5 Å del fragmento que contiene el motivo RGD en la estructura $\alpha 5\beta 1$. Esta región comprende los residuos Y227, F228, Q230, Q262, Q265, Q268 en la subunidad $\alpha 5$ y los residuos S152, Y153, S154, G243, N244, L245, S247, E249 en la subunidad $\beta 1$. Los cálculos de acoplamiento proteína-proteína se realizaron con HADDOCK v2.2 (de Vries *et al.*, 2010) generando 1,000 conformaciones. El mejor complejo TM11a- $\alpha 1\beta 5$ se

seleccionó de acuerdo con la función de puntuación HADDOCK y se analizó estructuralmente utilizando VMD v1.93 (Humphrey *et al.*, 1996).

6. RESULTADOS

6.1 Proteínas candidatas que interactúan con TMPRSS11a

Debido a que actualmente se desconoce la función que podría realizar TMPRSS11a dentro de la célula, en esta tesis nos propusimos buscar posibles proteínas candidatas de interacción con nuestra proteasa, mediante un ensayo de inmunoprecipitación y un posterior análisis proteómico utilizando espectrometría de masa acoplado a cromatografía líquida (LC-MS/MS).

En células HEK293 transfectamos el constructo plasmidial que codifica a TMPRSS11a y como control se utilizó el vector plasmidial que codifica para la proteína fluorescente verde (eGFP-N1). Para llevar a cabo el ensayo de inmunoprecipitación, utilizamos “beads” *ChromoTek Myc-Trap[®]_A*.

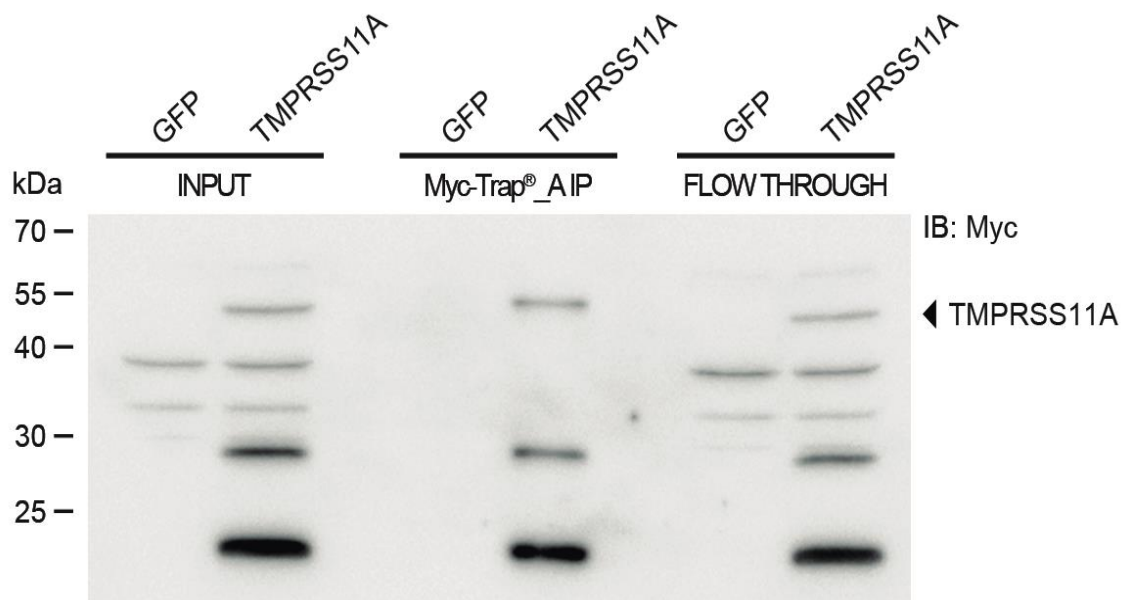


Figura 4. Inmunoprecipitación de TMPRSS11a utilizando el sistema *Myc-Trap[®]_A*.

Inmunoblot para TMPRSS11a. La figura muestra en los carriles de la izquierda los lisados (INPUT), en los carriles centrales la inmunoprecipitación (IP) y a la derecha de la imagen se muestra la fracción no-unida a las beads (Flow-Through). Cabeza de flecha indica la presencia de banda representativa de TMPRSS11a.

La *Figura 4*, muestra la inmunoprecipitación de células HEK293 que fueron transfectadas con el constructo codificante para la proteína TMPRSS11a, luego 48 horas post transfección, se llevó a cabo una inmunoprecipitación utilizando el sistema Myc-Trap, el cual permite una precipitación de alto rendimiento sin la interferencia de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

Posteriormente, las muestras de los inmunoprecipitados se analizaron por espectrometría de masa (LC-MS/MS) en la “Facility” de la Universidad de California, Davis y analizamos los datos en base a la presencia de espectros únicos; dando como resultado la identificación de 305 proteínas candidatas de interacción con TMPRSS11a. Estos candidatos fueron escogidos evaluando la presencia de estos péptidos únicos en los complejos inmunoprecipitados de TMPRSS11a y la ausencia de estos mismos en la condición control transfectadas con plasmidio EGFP.

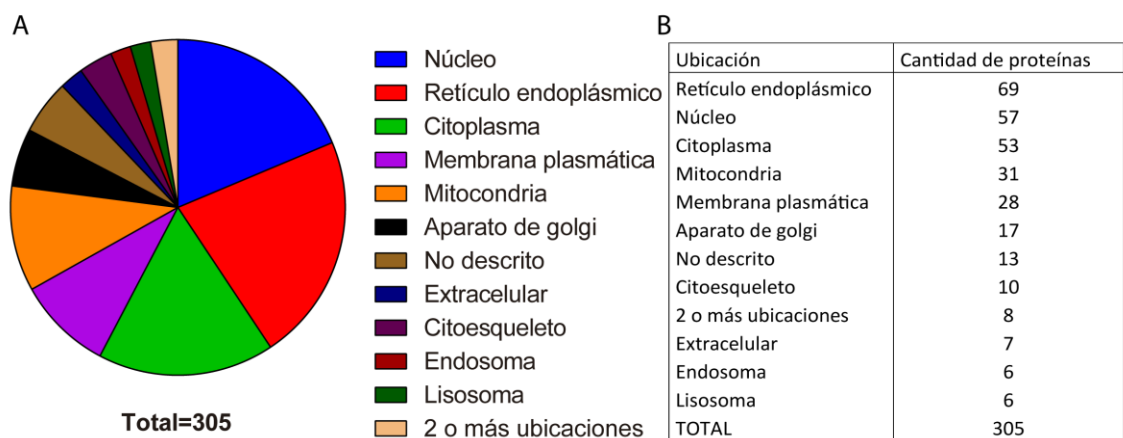


Figura 5. Distribución subcelular de las proteínas candidatas de interacción con TMPRSS11a.

(A) Grafico de torta muestra la distribución subcelular de los 305 candidatos de interacción con TMPRSS11a. (B) Tabla muestra la clasificación de proteínas que inmunoprecipitan con TMPRSS11a por su ubicación celular.

En la *Figura 5* se puede observar, una categorización de las proteínas candidatas de acuerdo con su localización celular. Interesantemente, un alto número de proteínas candidatas, corresponden a proteínas residentes del retículo endoplásmico (*Figura 5*). Dentro del mismo análisis, se realizó una selección de aquellas proteínas con un valor de cobertura de secuencia aminoacídica mayor a 30% y que la probabilidad de hallazgo fuese superior al 10% evitando de esa forma, identificar proteínas candidatas detectadas por azar, para de esa forma orientar el análisis de los candidatos de interacción.

Proteína	Coverage	Ubicación
TMPRSS11a	62%	
GRP78	53%	Retículo endoplásmico
60S acidic ribosomal protein P2	52%	Citoplasma
Heat shock 70 kDa protein 8	48%	Retículo endoplásmico
Cellular tumor antigen p53	40%	Citoplasma
Nucleophosmin, NPM	39%	Citoesqueleto
Calnexina	38%	Retículo endoplásmico
ERp57/ GRP58	37%	Retículo endoplásmico
Tubulin beta-III	33%	Citoesqueleto
Calreticulina	30%	Retículo endoplásmico

Tabla 2. Proteínas candidatas de interacción con un alto “coverage”.

Por otro lado, dentro de las candidatas con mayor valor de coverage, se encuentran proteínas que son residentes exclusivas del retículo endoplásmico y que están íntimamente relacionadas entre sí y con una función celular en común, el control del adecuado plegamiento proteico. En la *Tabla 2*, se muestran proteínas representativas (basadas en su valor de “coverage”) por organelo y función celular, donde la proteína de tipo lectina: Calnexina despertó

nuestro interés debido a que disminuye durante el envejecimiento (Choi & Kim, 2004), y es parte fundamental en el proceso de plegamiento proteico y, además, es una proteína de membrana residente en el retículo endoplásmico.

Dado estos resultados, quisimos estudiar la localización celular de esta proteasa, ya que estos datos muestran que podría interactuar no solo con proteínas de la membrana plasmática sino con proteínas de otros organelos membranosos como el retículo endoplásmico.

6.2 Localización subcelular de TMPRSS11a

TMRSS11a es de la familia de serina proteasas multidominios transmembrana tipo II y hasta la fecha se desconoce su localización dentro de la célula. Basados en los datos obtenidos por espectrometría de masa, donde los candidatos de interacción pertenecían a diversos organelos, es que decidimos evaluar la localización de TMPRSS11a, para esto, realizamos ensayos de inmunofluorescencia, en modelo celular de expresión heteróloga HEK293 que sobre expresan un plasmidio que contiene el gen para la proteasa TMPRSS11a (Myc-DDK-tagged TMPRSS11a) junto con marcadores de Retículo endoplásmico (KDEL-RFP) y Aparato de Golgi (mCherry-Golgi-7). Como marcador de membrana plasmática se utilizó Aglutinina de germen de trigo (WGA, por sus siglas en inglés).

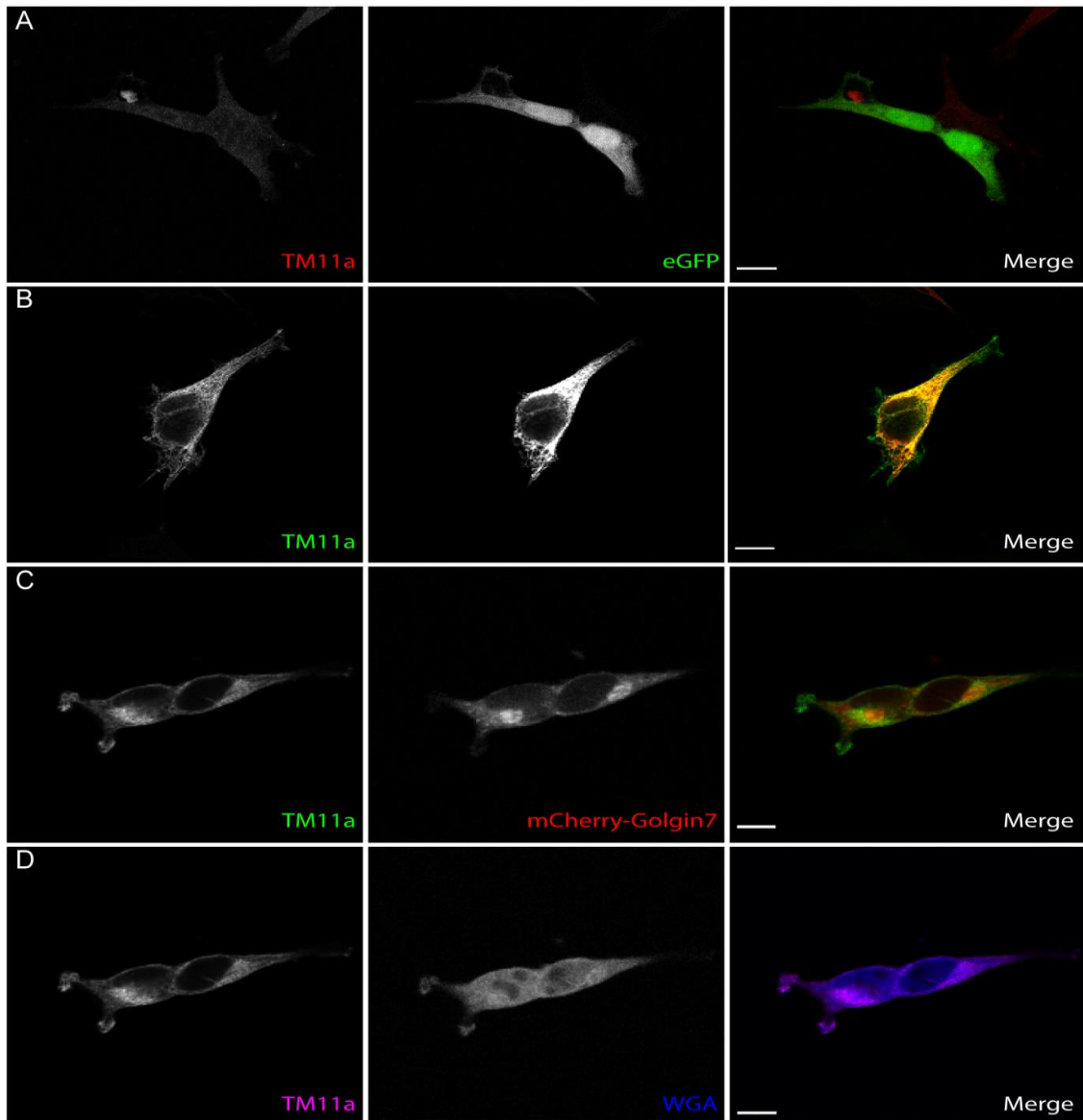


Figura 6. Microfotografías confocales de Inmunofluorescencia para TMPRSS11a con marcadores de Retículo endoplásmico, Golgi y Membrana plasmática.

Células HEK293T fueron transfectadas de forma transitoria con el constructo TM11a-FLAG. **(A)** Inmunofluorescencia para FLAG (rojo) y constructo GFP. **(B)** Inmunofluorescencia para FLAG (verde) y constructo KDEL-RFP, **(C)** Inmunofluorescencia para FLAG (verde) y constructo mCherry-Golgin7. **(D)** Inmunofluorescencia para FLAG (fucsia) y WGA (azul). Barra de escala: 5 μ m.

En la *Figura 6*, podemos observar una inmunofluorescencia, donde utilizamos anticuerpo anti FLAG para evaluar la expresión de TMPRSS11a. Se puede apreciar, que la proteasa presenta una localización prominente a nivel de

retículo endoplásmico, además de una cierta población tanto en aparato de Golgi como en membrana plasmática. Como control de localización se llevó a cabo una transfección con el constructo codificante para la proteína fluorescente verde, la cual se ubica a nivel citoplasmático y es posible evidenciar que no existe colocalización con TMPRSS11a, por lo que su ubicación subcelular se encuentra compartimentalizada.

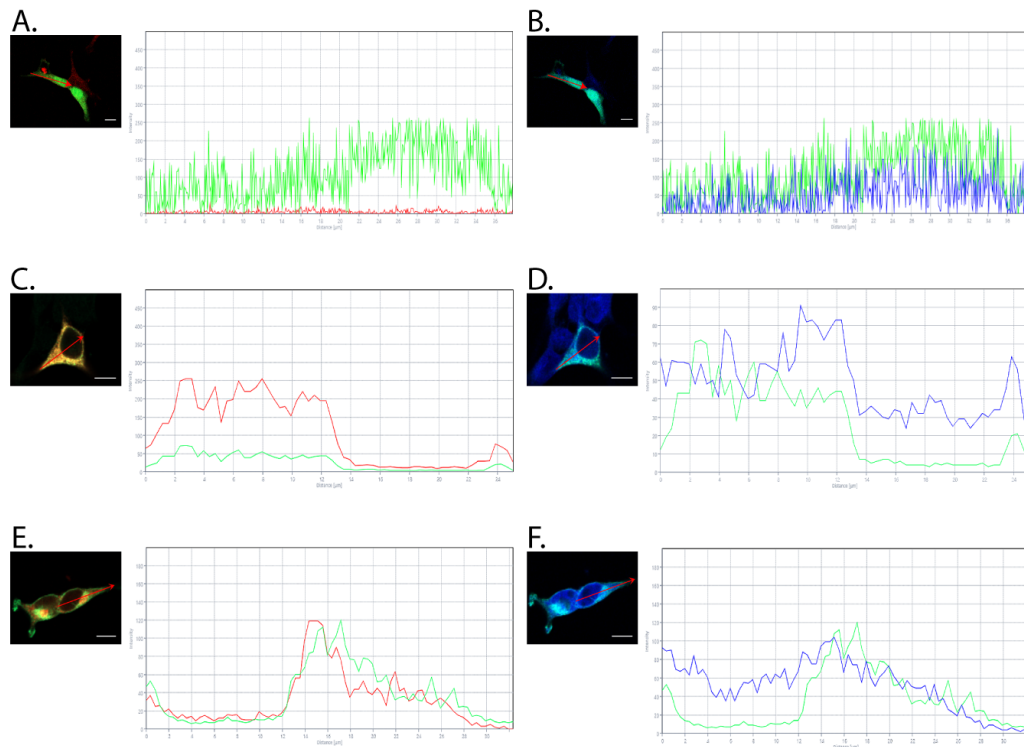


Figura 7. Análisis de intensidad de fluorescencia de TMPRSS11a con marcadores de organelo o estructura celular.

Gráfico muestra análisis de intensidad de fluorescencia pasando por el trazo rojo.

(A) Colocalización de TMPRSS11a (rojo) con eGFP (verde); **(B)** TMPRSS11a (verde) con WGA (azul); **(C)** Colocalización de TMPRSS11a (verde) con KDEL-RFP (rojo); **(D)** TMPRSS11a (verde) con WGA (azul); **(E)** Colocalización de TMPRSS11a (verde) con mCherry-Golgin7 (rojo); **(F)** TMPRSS11a (verde) con WGA (azul).

Los análisis de la *Figura 7*, muestran que existen perfiles de expresión similares de TMPRSS11a con los perfiles de expresión de las proteínas residentes en cada localización subcelular, lo que sumado a los coeficientes de correlación de Pearson (Retículo endoplásmico: $0,909 \pm 0,05$; Golgi: $0,784 \pm 0,19$; Membrana plasmática: $0,515 \pm 0,07$), corroboran que TMPRSS11a se ubica en estos compartimentos celulares. Además, como control, se evaluó el grado de colocalización de TMPRSS11a con la proteína fluorescente verde (*Figura 7A*).

Finalmente, para corroborar la ubicación en retículo endoplásmico, llevamos a cabo una inmunofluorescencia en células HEK293, co transfectadas con el constructo de la proteasa y un marcador específico de retículo endoplásmico fusionado a la proteína fluorescente mScarlet-i (*pCytERM_mScarlet-i_N1*).

Para evaluar si la localización obtenida en células HEK293 podría ser un artefacto del modelo de expresión heterólogo, llevamos a cabo un perfil de expresión de TMPRSS11a en líneas celulares de diversa malignidad (MCF7, MDA, B16, MKN27, MKN28 y A549). De esta forma, verificamos que A549 es la única línea celular analizada que sobre expresa TMPRSS11a.

En base a estos resultados utilizamos la expresión endógena de TMPRSS11a en células A549, en las que se evaluó su localización con marcadores de organelos como Calnexina (proteína residente de retículo endoplásmico) y Golgina- 97(proteína residente aparato de Golgi).

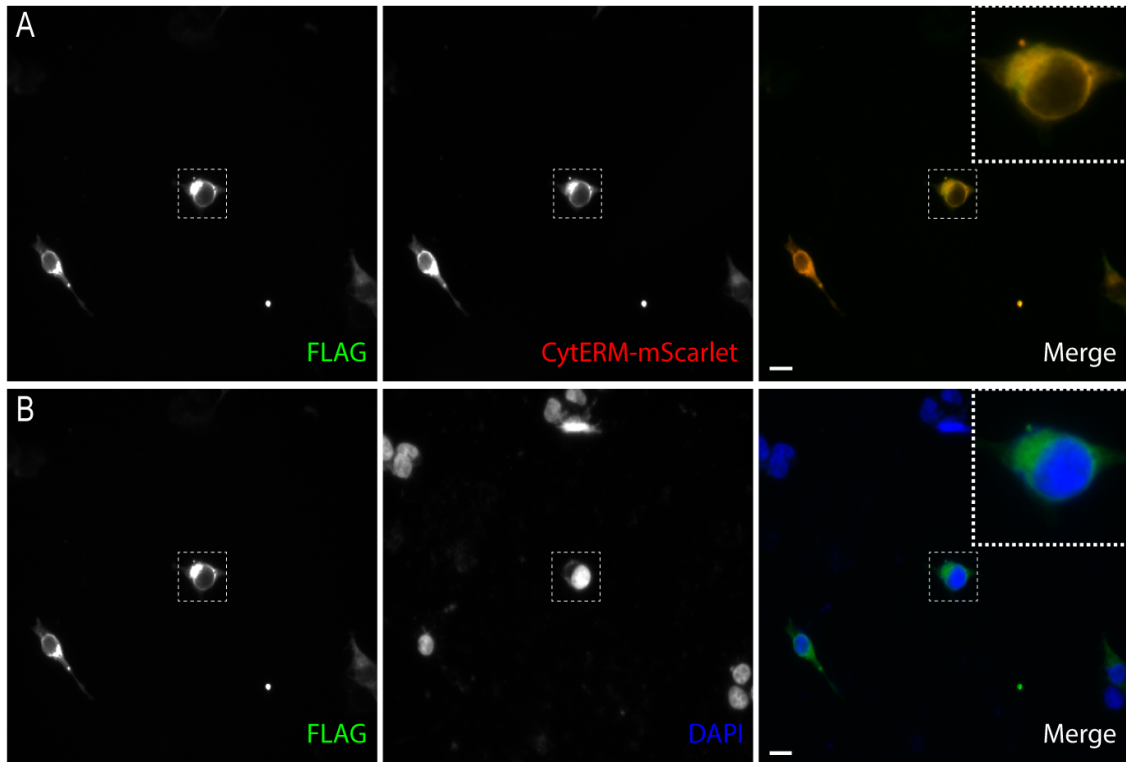


Figura 8. Microfotografías confocales de Inmunofluorescencia para TMPRSS11a con marcador específico de Retículo endoplásmico.

Células HEK293T fueron co transfectadas de forma transitoria con el constructo TM11a-FLAG y mScarlet-i-CytERM. **(A)**, Inmunofluorescencia para FLAG (verde) y constructo CytERM (rojo). **(B)** Inmunofluorescencia para FLAG (verde) y Hoechst (azul). Barra de escala: 5 μ m.

Como se puede apreciar en la *Figura 8*, existe una sugerencia de colocación importante de los marcajes tanto de TMPRSS11a como del marcador específico de retículo endoplásmico *CytERM*, corroborando de esta manera la ubicación de una población de la proteasa a nivel del retículo endoplásmico.

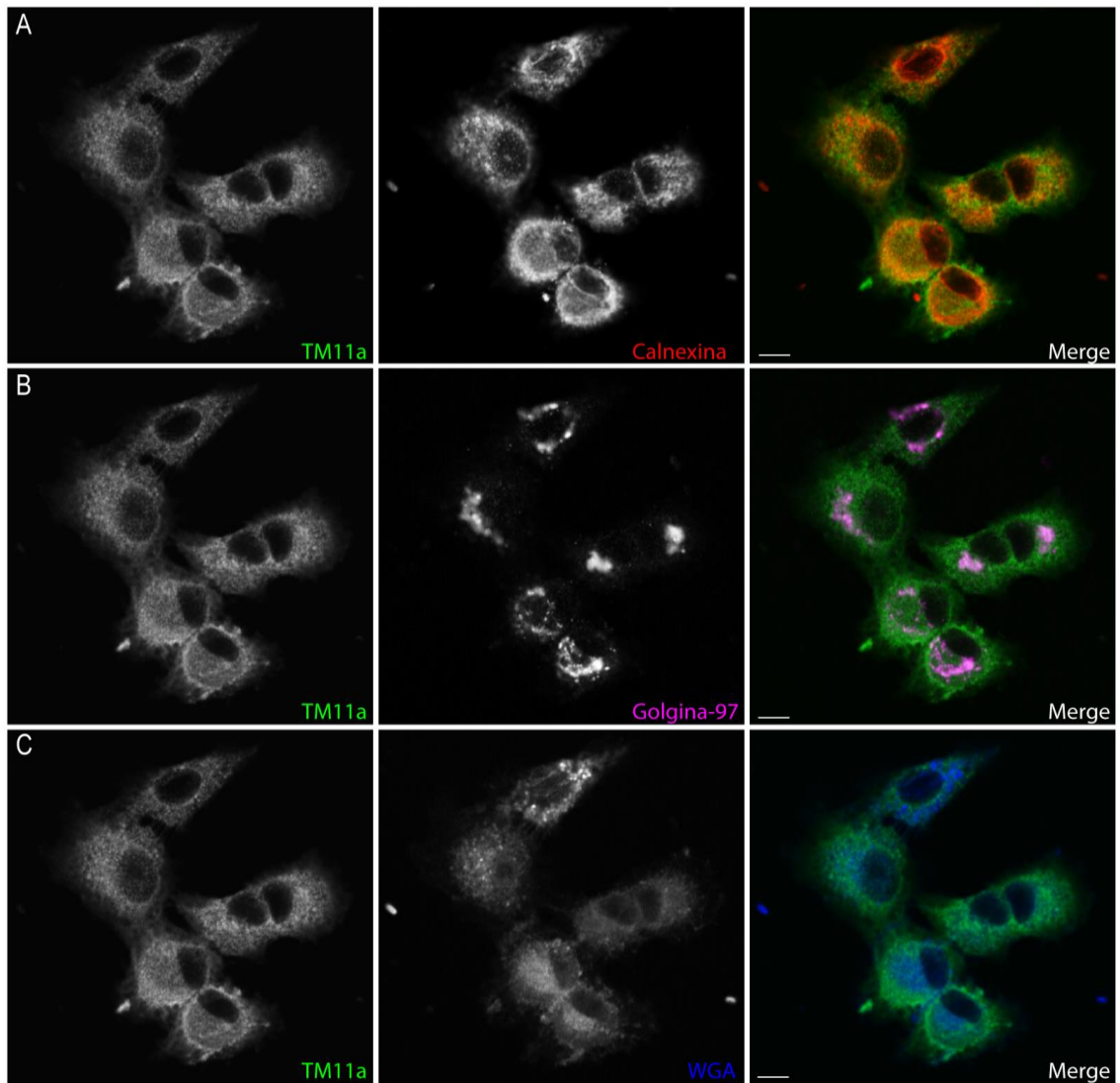


Figura 9. Microfotografías confocales de Inmunofluorescencia para TMPRSS11a con proteínas de Retículo, Golgi y membrana plasmática.

Inmunofluorescencia para **(A)** TMPRSS11a (verde), Calnexina (rojo); **(B)** TMPRSS11a (verde), Golgina97 (fucsia) y **(C)** TMPRSS11a (verde), WGA (azul). Barra de escala: 5 μ m.

En la *Figura 9*, se observa que el marcaje de TMPRSS11a colocaliza con el marcaje de la proteína de tipo lectina Calnexina (marcaje de color amarillo en IF *Figura 9*) y, además, presenta un coeficiente de correlación de Pearson de $0,732 \pm 0,022$. Por otro lado, la colocalización con golgina 97 también presenta

un cierto grado de colocalización, pero con un coeficiente de Pearson más bajo (coeficiente de Pearson: $0,666 \pm 0,196$). Finalmente, con WGA (marcador de membrana plasmática) existe un bajo nivel de correlación, mas no inexistente (coeficiente de Pearson: $0,490 \pm 0,119$).

En resumen, tanto la evidencia visual como la evidencia estadística permiten corroborar los datos de la localización de la expresión de TMPRSS11a obtenidos en el modelo de expresión heteróloga (*Figura 6-7-8*).

Para asegurar la autenticidad de los resultados obtenidos de la proteína endógena, validamos la especificidad del anticuerpo contra TMPRSS11a, mediante un inmunoblot, donde evaluamos lisados de células A549 sin transfectar y transfectadas con *scramble* y con interferentes contra TMPRSS11a, donde encontramos que la banda representativa de la proteasa (~ 50 kDa) se veía disminuida al utilizar concentraciones crecientes del interferente.

Para validar los datos de localización obtenidos a través de inmunofluorescencia, realizamos un ensayo de fraccionamiento celular, con el fin de obtener fracciones enriquecidas de organelos y de esta forma corroborar mediante otra técnica la localización subcelular de TMPRSS11a.

Para esto, células A549 fueron lisadas y mediante centrifugación diferencial se obtuvieron las distintas fracciones enriquecidas en organelos celulares. Como control de pureza de las fracciones se utilizaron los marcadores GRP78 para

retículo endoplásmico, GAPDH para citosol y Lamin A/C para la porción nuclear.

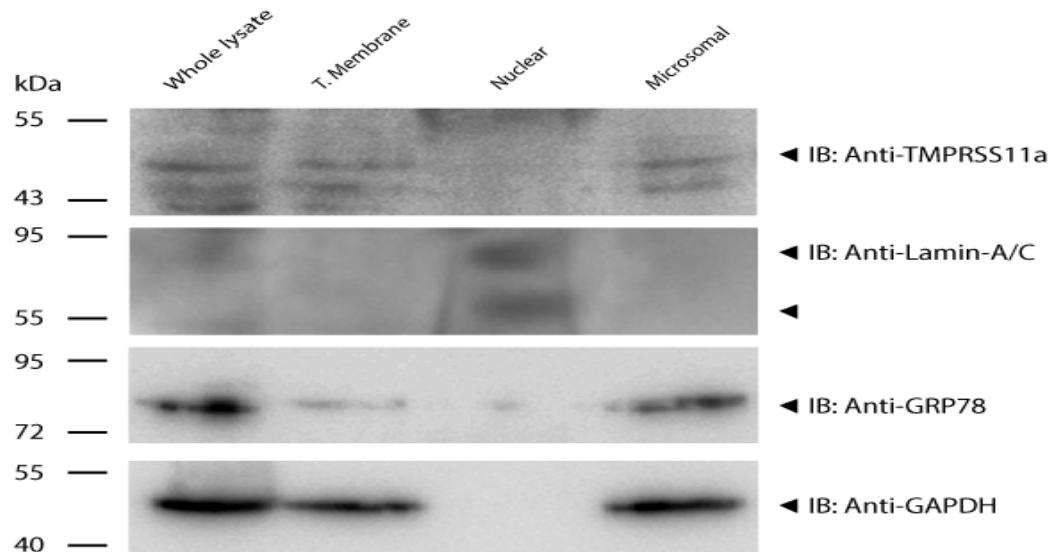


Figura 10. Fraccionamiento celular en células A549.

Inmunoblot para TMPRSS11a. Cabeza de flecha señala la presencia de TMPRSS11a. Como marcador nuclear se utilizó Lamina A/C, GRP78 se utilizó como control de retículo endoplásmico, mientras que GAPDH se utilizó como control citosólico.

En la *Figura 10*, observamos que existe una población TMPRSS11a ubicada en la fracción enriquecida de retículo endoplásmico. No obstante, también se aprecia TMPRSS11a en la fracción total de membrana y en la fracción de lisado completo (Whole Lysate).

Estos datos sugieren que TMPRSS11a a nivel subcelular, se localiza tanto en la membrana plasmática como en retículo endoplásmico, datos que fueron demostrados mediante ensayos de inmunofluorescencia y fraccionamiento celular.

Por otro lado, dentro de las proteínas candidatas se encontraban algunos miembros involucrados en tráfico endosomal. Para evaluar si TMPRSS11a se ubica en endosomas, llevamos a cabo una transfección con el constructo *Rab5Q79L-GFP* en células A549, el cual codifica para una mutante constitutivamente activa de Rab5 que forma endosomas de mayor tamaño a lo normal. Luego de 48 horas post transfección, realizamos una inmunofluorescencia.

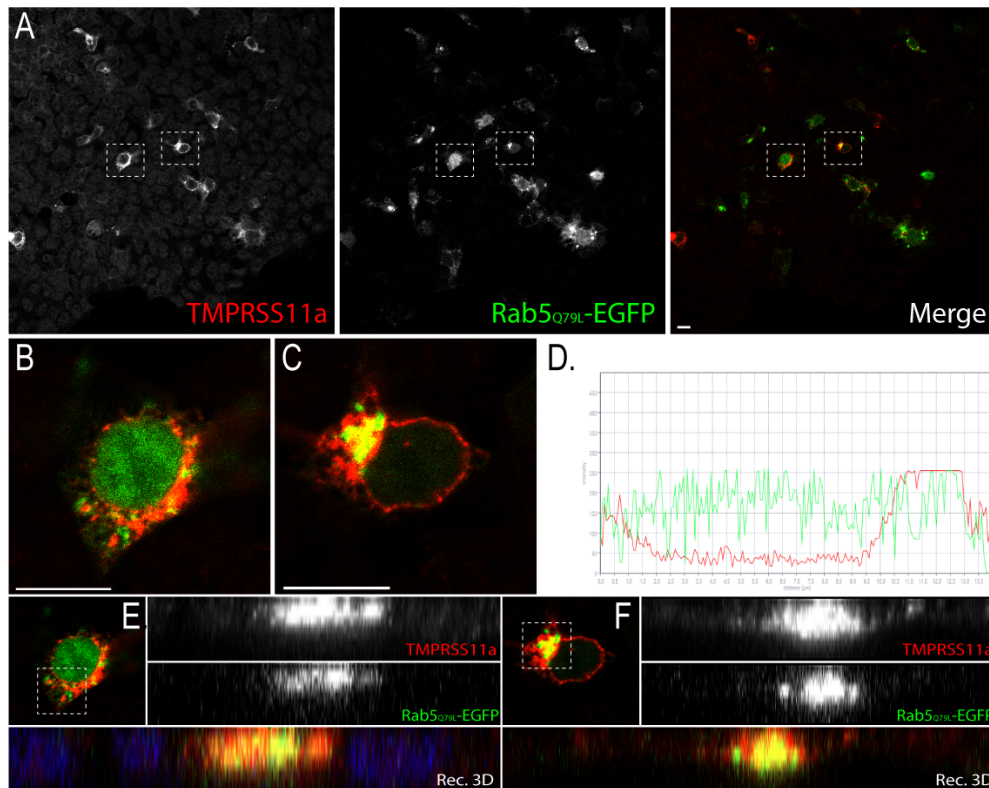


Figura 11. Microfotografías confocales de Inmunofluorescencia para TMPRSS11a.

(A) Inmunofluorescencia para TMPRSS11a (rojo) y Rab5Q79L (verde). (B) y (C) Magnificaciones de las células señaladas en (A). (D) Análisis de intensidad de fluorescencia y colocalización del marcaje de TMPRSS11a (rojo) con Rab5Q79L-EGFP (verde). (E) Reconstrucción tridimensional a partir de los cortes confocales de la zona delimitada, correspondiente a la célula señalada en (B), en azul se señala el núcleo celular. (F) Reconstrucción tridimensional a partir de los cortes confocales de la zona delimitada, correspondiente a la célula señalada en (C). Barra de escala: 5 μ m.

En la *Figura 11*, se observa un marcaje en amarillo de TMPRSS11a con la proteína Rab5 constitutivamente activa, sugiriendo una colocación, lo que nos indicaría que ambas proteínas se encuentran en endosomas de reciclaje. Los gráficos muestran el análisis de intensidad de fluorescencia en donde se observan perfiles similares en la expresión de TMPRSS11a y los endosomas Rab5 positivos.

Para confirmar los datos obtenidos por inmunofluorescencia, realizamos un ensayo de fraccionamiento de endosomas en células A549 (Torres *et al.*, 2008).

Células A549 fueron resuspendidas en amortiguador isotónico y lisadas de forma mecánica para posteriormente, realizar un gradiente de sacarosa y separar tanto endosomas tempranos como tardíos, basados en su densidad.

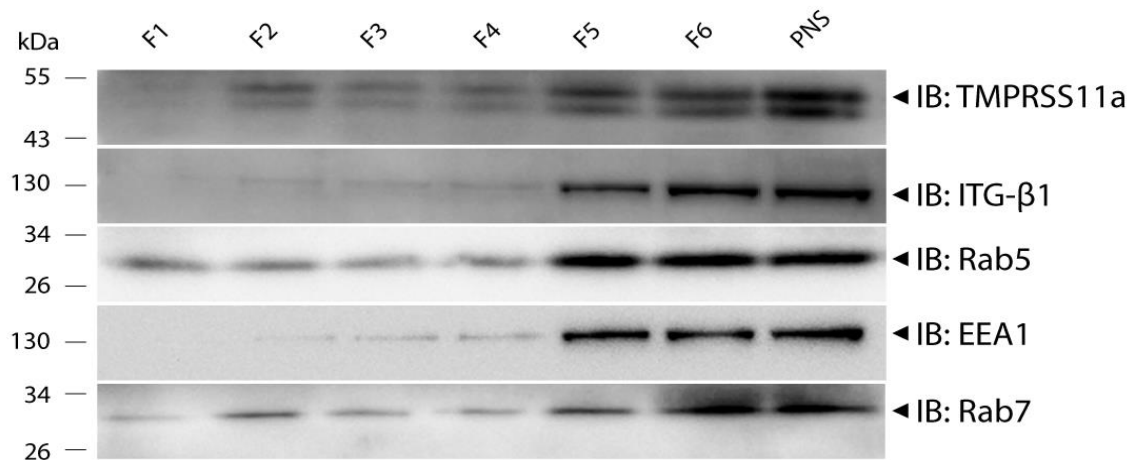


Figura 12. Fraccionamiento de endosomas.

Inmunoblot para TMPRSS11a. Cabeza de flecha indica presencia de TMPRSS11a e Integrina Beta-1. Como marcador de endosomas tempranos se utilizó Early Endosome Antigen 1 (EEA1) y para endosomas tardíos Rab7, Rab5 se utilizó como marcador específico de endosomas tempranos de reciclaje. PNS (Post Nuclear Supernatant), se utilizó como control positivo.

Como se muestra en la *Figura 12*, TMPRSS11a presenta la misma distribución a lo largo del gradiente que los endosomas tempranos, representados por el marcador EEA1. Además, TMPRSS11a se encuentra en la fracción enriquecida en endosomas tardíos (Rab7 positivos), lo que da cuenta de la presencia de esta serina proteasa en endosomas. En el caso de Integrina $\beta 1$, es sabido que parte de su reciclaje dinámico está mediado por endosomas tempranos de reciclaje (EEA1/ Rab5 positivos) (Moreno-Layseca *et al.*, 2019) y, además, presenta la misma distribución que TMPRSS11a en el gradiente de densidades. Finalmente, todos los datos anteriores sugieren fuertemente que TMPRSS11a, presenta una localización en el retículo endoplásmico, poblaciones en membrana plasmática y endosomas tempranos.

6.3 Interactoma asociado a TMPRSS11a.

Utilizando los datos obtenidos por el análisis de la espectrometría de masa y considerando la ubicación de TMPRSS11a y de sus proteínas candidatas, es que se procedió a validar la interacción de la proteasa con algunas de las proteínas candidatas. Dentro de las proteínas candidatas, destacó el grupo relacionado funcionalmente con el proceso de control de calidad del plegamiento proteico, dentro de este grupo tenemos a las proteínas Glucose Response Protein 78 kDa (GRP78, o bien, Chaperona Bip) y la proteína tipo lectina Calnexina; esta última nos llamó poderosamente la atención, dado que fue descrito por Choi y Kim (2004), que durante el envejecimiento, calnexina

disminuye su expresión asociado al envejecimiento, siendo esto lo que podría explicar la disminución en la respuesta al estrés de individuos envejecidos y la prevalencia a padecer enfermedades ligadas al envejecimiento.

Para evaluar si existe interacción entre Calnexina (una proteína con localización exclusiva en retículo endoplásmico) y nuestra proteasa (la cual en resultados anteriores ubicamos en retículo endoplásmico), es que llevamos a cabo un ensayo para determinar proximidad entre 2 epítopes, PLA (Proximity Ligation Assay) (*Figura 13*).

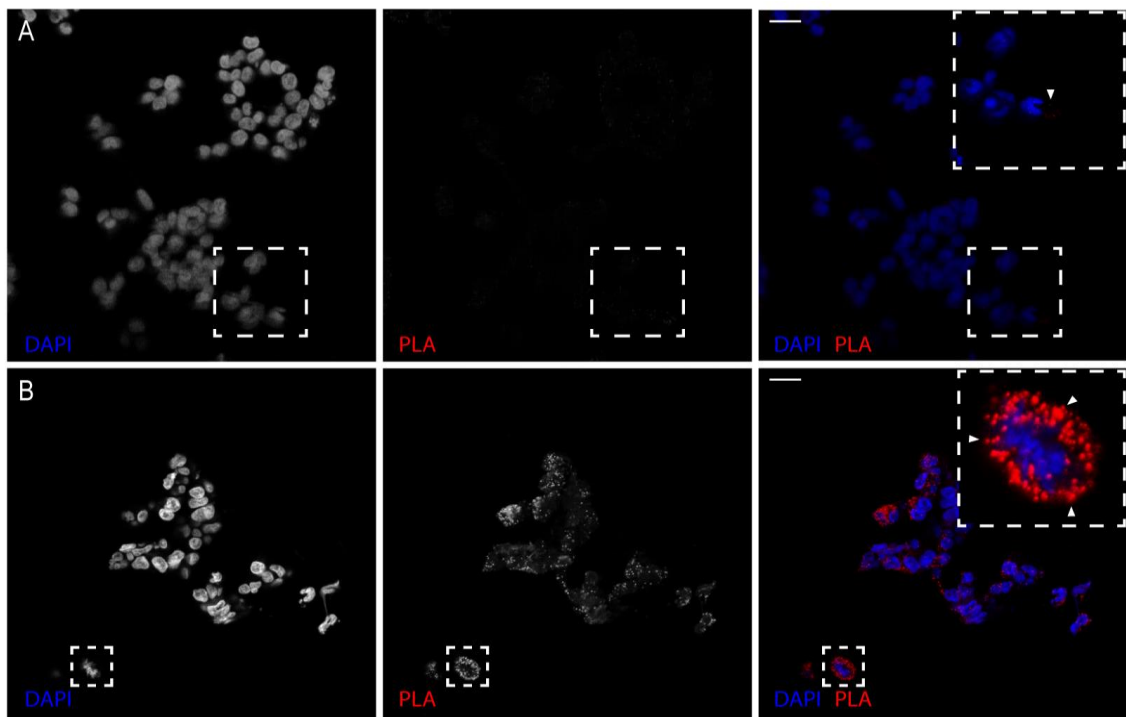


Figura 13. Ensayo de ligación proximal (PLA).

Microfotografía de células A549, donde se muestra el marcaje nuclear, DAPI (azul) y la señal positiva de interacción (rojo). **(A)** Control negativo PLA y **(B)** Interacción entre TMPRSS11a y Calnexina. Barra de escala: 5 μ m

En la *Figura 13*, se observa una señal de amplificación de la sonda fluorescente formada por las sondas *Mouse (PLUS)* y *Rabbit (MINUS)*, lo que se visualiza como un marcaje puntiforme rojo. Este marcaje puntiforme, indica que los epítopes reconocidos (TMPRSS11a y Calnexina) se encuentran a una distancia menor a 40 nm de distancia por lo que las sondas pueden complementarse y ser amplificadas por la enzima. Lo anterior sugiere que TMPRSS11a y Calnexina se encuentran cerca o bien, interactúan de forma directa.

7. DISCUSIÓN

Dentro de los hallazgos realizados por nuestro laboratorio y documentados en este trabajo de tesis, se encontró que TMPRSS11a en modelo de células humanas HEK293 y A549 se localiza en membrana plasmática, que es donde se describe de manera putativa y, además, en retículo endoplásmico y endosomas tempranos. Estas ubicaciones son altamente relevantes debido a que pueden orientar hacia la función que cumple TMPRSS11a a nivel celular, participando en la inducción de senescencia celular (Zhao *et al.*, 2006).

Por otro lado, TMPRSS11a posee un dominio tipo tripsina S1, lo que la hace pertenecer al grupo de serina proteasas; su localización en retículo endoplásmico supone un hallazgo fascinante, dado que, en la actualidad, existen pocas o nulas proteasas descritas en este organelo membranoso. Además, debido a su clasificación de proteína de membrana tipo II, este dominio catalítico S1 se encuentra orientado hacia la cara luminal del retículo, así mismo, este trabajo describe la interacción con la proteína Calnexina, lo que hace aún más interesante su estudio.

A su vez, el hecho de que TMPRSS11a se ubique en endosomas y membrana plasmática, puede orientar hacia otra función de esta proteasa, lo que la convierte en una proteína con funciones pleiotrópicas dentro de la célula. En la actualidad, los análisis proteómicos permiten generar un gran abanico de candidatos de estudio para diversos procesos celulares. Dentro de este abanico

de proteínas candidatas de interacción con TMPRSS11a, se encuentran proteínas involucradas en procesos biológicos de variada complejidad, dentro de estos grupos hay uno que nos llama poderosamente la atención, migración y adhesión celular, ambos procesos son cruciales para el éxito de la reparación de tejidos dañados y son precisamente estas funciones las que se ven afectadas de gran manera durante el envejecimiento.

En lo que respecta a los candidatos de interacción con la serina proteasa 11a, encontramos, aunque con bajo *coverage*, dos proteínas que presentan espectros únicos, Rab5 e Integrina $\alpha 5\beta 1$.

Rab5 recientemente ha sido descrita como parte de los efectores de la kinasa de adhesiones focales (FAK, por sus siglas en inglés) (Arriagada *et al.*, 2019) y, por otro lado, la integrina $\alpha 5\beta 1$ es uno de los receptores de fibronectina y que se utiliza como un blanco terapéutico contra el desarrollo tumoral (Schaffner *et al.*, 2003; Moreno-Layseca *et al.*, 2019). TMPRSS11a colocaliza fuertemente con Rab5 en endosomas tempranos de reciclaje (Rab5⁺ EEA1⁺) (*Figura 11 y 12*). De manera que no es extraño pensar, que TMPRSS11a puede estar involucrada junto con Rab5 en el reciclaje dinámico de integrinas y de esta forma, mediar la respuesta migratoria o de adhesión de las células y en un nivel macro, mermar la reparación de heridas durante el envejecimiento.

Esto nos llevó a analizar la secuencia de TMPRSS11a (*Figura 14*) en busca de secuencias de interés o relevancia biológica, donde encontramos el dominio

RGD, dominio funcional de reconocimiento por parte de integrinas (Moreno-Layseca *et al.*, 2019).

```

MMYRTVGFGRSRNLKPWMIAVLIVLSLTVVAVTIGLLVHFLVFDQKEYYHGSFKILDPOINNNFGQSNTYQ
LKDLETENLVSQVDEIFIDSAWKKNYIKNOVVRLTPEEDGVKVDVIMVFQFPSTEQRVREKKIQSILNQK
IRNLRALPINASSVQVNAMSSSTGELTVQASCGKRVVPLNVNRASGVIAPKAAPWQASLOYDNIHQCGATI
ISNTWLVTAAHCFQKYKNPHQWTVSFGTKINPPLMKRNVRRFIHEKYRSAAREYDIAVVQVSSRVTFSDDIR
RICLPEASASFQPNLTVHITGFGALYGGESQNDLREARVKIISDDVCKQPQVYGNDIKPGMFCAGYMEGIYD
ACRGDSGGPLVTRDLKDTWYLGIVSWGDNCGQKDKPGVYTVQVYRNWIASKTCI

```

Figura 14. Secuencia aminoacídica de TMPRSS11a.

Secuencia de 421 aminoácidos de la proteasa TMPRSS11a (isoforma 1). En calipso se muestra el dominio intracelular (amino terminal), en gris se muestra el dominio transmembrana. En verde se señala el dominio SEA (extracelular) y en rojo el dominio tipo tripsina S1. Letras blancas muestran la tríada catalítica (H230, D275 y S371), mientras que en amarillo se señala el dominio RGD.

Este dominio está presente en todos aquellos componentes de matriz extracelular que son capaces de activar transduccionalmente a los receptores de integrinas para de esta forma comunicar cambios del medio externo al medio intracelular, los cuales se manifiestan al modular las dinámicas de filamentos de actina. Al analizar las secuencias de otras proteínas pertenecientes a la familia TTSP, con el fin de buscar el motivo RGD, ninguna otra proteasa perteneciente a esta familia, salvo TMPRSS11a lo presenta, lo que nos hace pensar que este dominio puede jugar algún rol tanto para la proteasa como para la integrina.

Hasta la fecha se desconoce la estructura cristalina de nuestra proteasa en estudio, por lo que se hace complejo evaluar cómo podría estar interactuando con otras proteínas o bien, si este motivo estructural RGD constituye un dominio funcional de interacción con integrinas. Es por esto que, mediante una colaboración con la Universidad de Talca, fue posible obtener una simulación

estructural del dominio catalítico de TMPRSS11a, proporcionándonos otras herramientas bioquímicas para evaluar la interacción con otras proteínas.

En colaboración con el Centro de Bioinformática y Simulación Molecular (Universidad de Talca), llevamos a cabo la simulación estructural del dominio catalítico tipo Tripsina S1 de TMPRSS11a, utilizando como modelo predictivo el cristal de TMPRSS11e perteneciente a la misma familia (PDB Access code # 2OQ5); para de esta forma evaluar la posible funcionalidad del dominio RGD presente en la proteasa 11a.

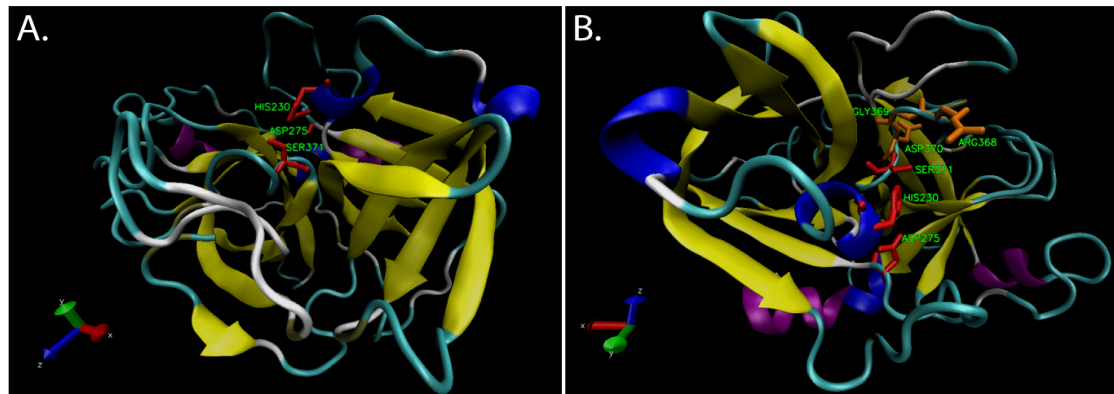


Figura 15. Modelado estructural del dominio catalítico de TMPRSS11a.

Representación tridimensional del dominio catalítico tipo tripsina S1 de TMPRSS11a, **(A)** en rojo se señalan los aminoácidos pertenecientes a la triada catalítica (H230, D275 y S371). **(B)** mientras que en naranja se muestra el dominio RGD (R368, G369 y D370). Autores: Dra. Mónica Cáceres, Dra. Ariela Vergara, Roberto Rosales y Christian Fernández.

Interesantemente, el dominio RGD está ubicado frente a la Serina catalítica 371 (*Figura 15B*) e inmerso en el bolsillo hidrofóbico donde se encuentra la triada catalítica (H230, D275 y S371) (*Figura 15A*).

Este hallazgo despierta interés en nuestro laboratorio, debido a que se suma a las respuestas celulares que involucran tanto a Tmprss11a, Rab5 e Integrina, por lo que, se llevó a cabo una simulación de acoplamiento molecular entre el modelo simulado de Tmprss11a (dominio S1) y el cristal de Integrina $\alpha 5\beta 1$ (PDB Access code # 3VI4).

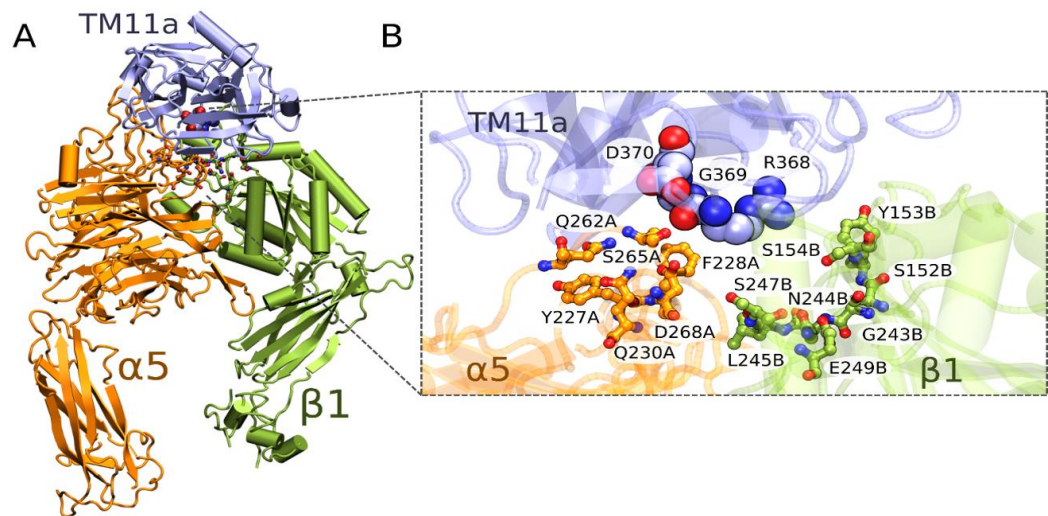


Figura 16. Acoplamiento molecular entre Tmprss11a y ITG $\alpha 5\beta 1$.

(A) En color naranja se muestra la subunidad alfa de la integrina, mientras que en verde se muestra la subunidad beta. (B) Acoplamiento molecular entre Tmprss11a (morado) y ITG $\alpha 5\beta 1$ (cadena alfa en naranja; cadena beta en verde). Aumento muestra en detalle la interacción simulada, destacando los aminoácidos posiblemente involucrados en la interacción debido a que se encuentran a < 10 nm. Autores: Dra. Mónica Cáceres, Dra. Ariela Vergara, Roberto Rosales y Christian Fernández.

La simulación dio como resultado una posibilidad de interacción entre ambas proteínas, mediante el dominio RGD y aminoácidos ubicados a 8 nm, tanto de la cadena alfa como de la cadena beta de la integrina en su conformación activa (Y186A, Q221A, S224A; Y133B, S134B, S132B, F187B, L225B, entre otros) (Figura 16). Esta simulación se suma a las evidencias que existen de que

TMPRSS11a puede estar modulando procesos relacionados con migración y adhesión, al interactuar con actores importantes de ambos procesos.

Finalmente, dentro de las proteínas candidatas de interacción, llama la atención que un gran porcentaje de estas 305 proteínas corresponda a proteínas residentes del retículo endoplásmico y más fascinante aun, es que de estas proteínas, las que presentan un mayor valor de “*coverage*” sean aquellas proteínas que están involucradas con el ciclo de control del plegamiento proteico; mecanismo de control fundamental en el “*fitness*” de las células y además, ha sido descrito que la falla en este sistema de control, es conocido como uno de los mecanismos de inducción de la senescencia celular al activar la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés) (Naidoo 2009).

8. CONCLUSIONES

- TMPRSS11 localiza en Retículo endoplásmico, membrana plasmática y endosomas.
- TMPRSS11a colocaliza con Calnexina, resultados demostrados por inmunofluorescencia y PLA.
- TMPRSS11a interactúa con Calnexina y tiene una posible interacción con Integrina $\beta 1$.

9. PROYECCIONES

Los hallazgos realizados en esta memoria de tesis referentes tanto a la localización subcelular como a las proteínas que interactúan con TMPRSS11a (Calnexina e Integrina), sitúan a esta proteasa como una proteína con funciones pleiotrópicas, las cuales se ven moduladas por su ubicación dentro de la célula y a su vez, moduladas también por su interactoma. La evidencia aquí descrita, permite situar a la serina proteasa TMPRSS11a como un nuevo blanco de estudio durante el envejecimiento y como al ser modulado puede afectar procesos como el estrés de retículo endoplásmico al estar interactuando con la proteína calnexina, o bien, al modular su expresión o función, afecta respuestas celulares como la adhesión o la migración celular. Basados en lo anterior, proponemos el siguiente modelo.

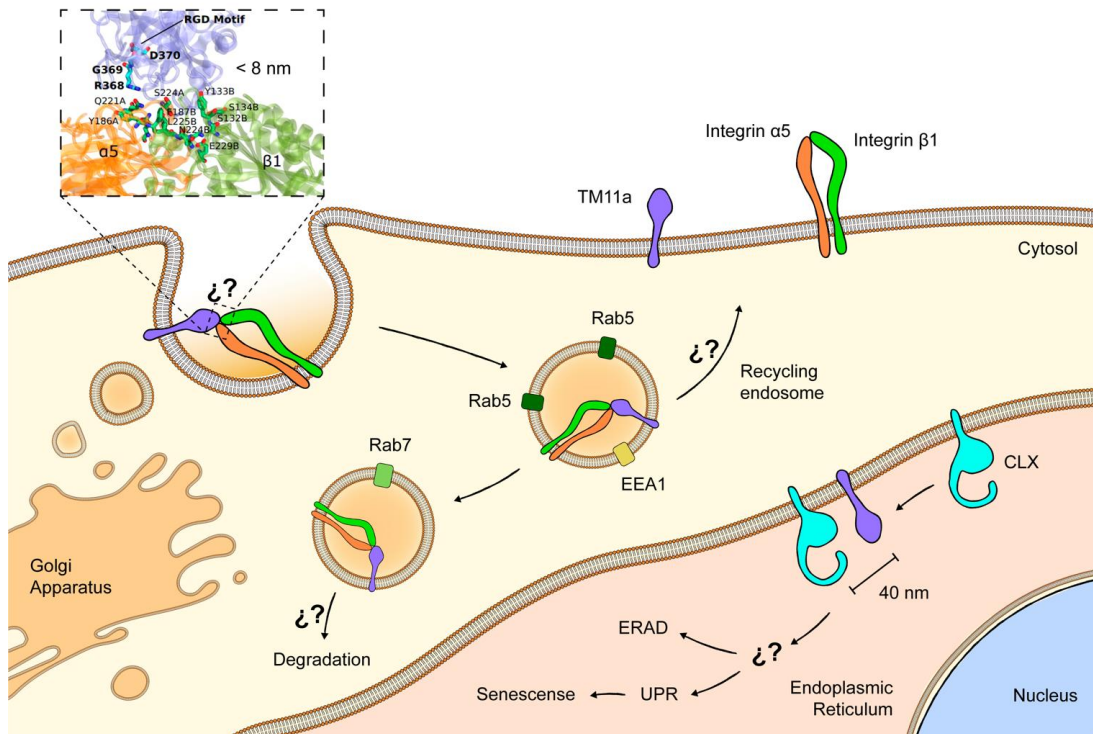


Figura 17. Modelo propuesto para TMPRSS11a.

TMRSS11a (señalada en morado), presenta poblaciones ubicadas en la membrana plasmática, endosomas y retículo endoplásmico. Dependiendo de su ubicación y sus proteínas de interacción cumple variadas funciones, de esta forma en la membrana plasmática puede afectar procesos asociados a la interacción con matriz extracelular; en endosomas puede afectar el reciclaje como la degradación y activación conformacional de integrina; mientras que, en retículo endoplásmico, al interactuar directamente con Calnexina podría, mediante un mecanismo desconocido, inducir respuestas como ERAD o UPR. Autor: BQ Diego Morales.

La Figura 17, muestra el modelo propuesto para TMPRSS11a, donde se sugiere que esta proteasa puede estar ubicada en membrana plasmática, endosomas, donde podría interactuar con integrinas y de esta forma, puede estar modulando respuestas celulares asociadas a la interacción con la matriz extracelular y el dinamismo del citoesqueleto. Por otro lado, también se muestra que TMPRSS11a está ubicada en retículo endoplásmico, interactuando con calnexina. Queda a modo de proyección para futuras investigaciones, el

determinar cómo estas ubicaciones e interacciones de esta serina proteasa afectan el rendimiento de las células que la expresan y como esto, afecta de igual forma respuestas celulares tanto asociadas a estrés de retículo endoplásmico (UPR y ERAD) como a interacciones con la matriz extracelular. De esta forma finalmente, descifrar el mecanismo mediante el cual TMPRSS11a es capaz de inducir senescencia y sabiendo esto, podría constituir un blanco modulable durante el envejecimiento.

10. REFERENCIAS

Antalis, T. M., Buzza, M. S., Hodge, K. M., Hooper, J. D., & Netzel-Arnett, S. (2010). **The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment.** *Biochemical Journal*, 428(3), 325–346.

Arriagada, C., Silva, P., Millet, M., Solano, L., Moraga, C., & Torres, V. A. (2019). **Focal adhesion kinase-dependent activation of the early endocytic protein Rab5 is associated with cell migration.** *Journal of Biological Chemistry*, jbc.RA119.008667.

Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., ... van Deursen, J. M. (2011). **Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders.** *Nature*, 479(7372), 232–236.

Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). **Cellular senescence: when bad things happen to good cells.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740.

Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. (2015). **Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy.** *Nature Medicine*, 21(12), 1424–1435.

Choi, B.-H., & Kim, J.-S. (2004). **Age-related decline in expression of calnexin.** *Experimental & Molecular Medicine*, 36(5), 499–503.

Contrepois, K., Coudereau, C., Benayoun, B. A., Schuler, N., Roux, P.-F., Bischof, O., ... Mann, C. (2017). **Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression.** Nature Communications, 8, 14995.

Fontana, L., Kennedy, B. K., Longo, V. D., Seals, D., & Melov, S. (2014). **Medical research: Treat ageing.** Nature, 511(7510), 405–407.

He, S., & Sharpless, N. E. (2017). **Senescence in Health and Disease.** Cell, 169(6), 1000–1011. Baker 2011

Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996). **VMD - Visual Molecular Dynamics.** J. Molec. Graphics, vol. 14, pp. 33-38.

Kennedy, B. K., Berger, S. L., Brunet, A., Campisi, J., Cuervo, A. M., Epel, E. S., ... Sierra, F. (2014). **Geroscience: Linking Aging to Chronic Disease.** Cell, 159(4), 709–713.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). **The Hallmarks of Aging.** Cell, 153(6), 1194–1217.

Moreno-Layseca, P., Icha, J., Hamidi, H., & Ivaska, J. (2019). **Integrin trafficking in cells and tissues.** Nature Cell Biology.

Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). **Cellular senescence: from physiology to pathology.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15(7), 482–496.

Naidoo, N. (2009). **ER and aging—Protein folding and the ER stress response**. *Ageing Research Reviews*, 8(3), 150–159.

Netzel-Arnett, S., Hooper, J.D., Szabo, R., Madison, E.L., Quigley, J.P., Bugge, T.H., & Antalis, T.M. (2003). **Membrane anchored serine proteases: A rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer**. *Cancer and Metastasis Reviews*, 22, 237-258.

Rasool, S., Khan, T., Qazi, F., & Ganai, B. A. (2013). **ECRG1 and Its Relationship with Esophageal Cancer: A Brief Review**. *Onkologie*, 36(4), 213–216.

Rodier, F., & Campisi, J. (2011). **Four faces of cellular senescence**. *The Journal of Cell Biology*, 192(4), 547–556.

S.J. de Vries, M. van Dijk and A.M.J.J. Bonvin. (2010). **The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking**. *Nature Protocols*, 5, 883-897.

Sales, K. U., Hobson, J. P., Wagenaar-Miller, R., Szabo, R., Rasmussen, A. L., Bey, A., ... Bugge, T. H. (2011). **Expression and Genetic Loss of Function Analysis of the HAT/DESC Cluster Proteases TMPRSS11A and HAT**. *PLoS ONE*, 6(8), e23261.

Schaffner, F., Ray, A., & Dontenwill, M. (2013). **Integrin $\alpha 5\beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors**. *Cancers*, 5(4), 27–47.

Smith, P. C., Cáceres, M., Martínez, C., Oyarzún, A., & Martínez, J. (2014). Gingival Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 94(3), 395–402.

Torres, V. A., Mielgo, A., Barilà, D., Anderson, D. H., & Stupack, D. (2008). **Caspase 8 Promotes Peripheral Localization and Activation of Rab5.** *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36280–36289.

Zhao, N., Huang, G., Guo, L., & Lu, S.-H. (2006). **ECRG1, a Novel Candidate of Tumor Suppressor Gene in the Esophageal Carcinoma, Triggers a Senescent Program in NIH3T3 Cells.** *Experimental Biology and Medicine*, 231(1), 84–90.

Zhao, N., Wang, J., Cui, Y., Guo, L., & Lu, S.-H. (2004). **Induction of G1 cell cycle arrest and P15INK4b expression by ECRG1 through interaction with Miz-1.** *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(1), 65–76.