



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**“ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LA HISTONA H3
CITOSÓLICA MAL PLEGADA POR EL SISTEMA
UBIQUITINA-PROTEOSOMA”**

Memoria para optar al Título de Bioquímica

CLAUDIA ANDREA ESPINOZA ARRATIA

PROFESORA PATROCINANTE

Dra. Lorena García Nannig

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas

DIRECTORA DE MEMORIA

Dra. María Alejandra Loyola Pedevila

Laboratorio de Epigenética y Cromatina

Fundación Ciencia & Vida

Santiago - Chile
2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN DE MEMORIA DE TÍTULO

Se informa a la Dirección de Pregrado de la Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas que la Memoria de Título presentada por:

CLAUDIA ANDREA ESPINOZA ARRATIA

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora como requisito para optar
al Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día
_____ del año 2017.

Directora de Memoria:

Dra. María Alejandra Loyola Pedevila

Profesora Patrocinante:

Dra. Lorena García Nannig

Comisión Evaluadora:

Dr. Andrés Barriga González

Dr. Alfonso Paredes Vargas

Esta memoria de título, realizada en el Laboratorio de Epigenética y Cromatina de la Fundación Ciencia & Vida, contó con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 1160480 y del Proyecto Basal PFB-16.

“Por la libertad, así como por la honra, se puede y se debe aventurar la vida [65]”

AGRADECIMIENTOS

Para empezar, a todo el laboratorio de Epigenética y Cromatina de la Fundación Ciencia & Vida. A la doctora Loyola que me dejó realizar esta memoria en su laboratorio. A todo Cromatina I, al Carlos y a la Pola que me ayudaron en los primeros pasos en el mundo de las histonas. Al Checho, un faro de sabiduría y el empleado del mes, siempre dispuesto a ayudar. A los pregrados del lab: el Dani y el Seba. A la Pancha y a la Pili, con las que se formó una amistad más allá de las pipetas. A la Betsi, al Víctor y la Javi, cromatina honorarios. A los de Cromatina II que me dieron asilo político: la Maca, el Cristian y la Srta. Chica. Al Juan, que me enseñó todo lo que se de biología molecular y de lanzamiento de cartas, y en especial al señor Francisco porque, aunque es un hombre de pocas palabras, siempre estuvo dispuesto a responder mis dudas, incluso la más importante: ¿Qué es una histona?. Creo que es difícil encontrar un grupo de gente en que todos se lleven bien, y en que el apoyo y las risas sean lo principal... tuve suerte.

A la Gaby y al Rubén, que siguen aguantándome desde el colegio (y viceversa).

A los cabros de la U: la Darlyng, la Maca, la Bárbara, la Coni, la Vero, el Isidro, el Apu, la Pauli, la Laura (Brasil), la Vale y la Ale, que apañaron en los largos (eternos) años de estudio, en los trabajos, en las partidas de Uno... en general, a hacer más llevadero todo.

Y finalmente a mis padres, que sin ellos no estaría aquí (en todo sentido). A mi madre que me levantó por años en las mañanas, y que sin ella no hubiera ni terminado el jardín infantil. A mi padre que me acarrea a todos lados, y que también me arrastró (metafóricamente) por los largos años de estudio. Todo esto es una prueba superada, pero vienen más, que espero sigamos enfrentando juntos.

ÍNDICE GENERAL

Índice general	1
Índice de figuras	4
Abreviaturas	6
Resumen	8
Abstract	9
1 – Introducción	10
1.1 - Histonas y su función a nivel celular	10
1.2 - Procesamiento celular de histonas recientemente sintetizadas	11
1.3 - Regulación de los niveles proteicos de la histona	14
1.3.1 - Acción de chaperonas específicas de histonas	14
1.3.2 - Degradación mediante la autofagia mediada por chaperonas	15
1.3.3 - Degradación mediante el sistema ubiquitina-proteosoma	18
2 - Hipótesis	22
3 – Objetivos	22
4 – Materiales	23
4.1 - Anticuerpos primarios y secundarios	23
4.2 - Fármacos	23
4.3 - Kits comerciales	24
4.4 - Otros	24
4.5 - Químicos sólidos	24
4.6 - Químicos líquidos	25

4.7 - Soluciones y amortiguadores	25
5 – Métodos	27
5.1 - Tratamiento de las células HeLa con distintos fármacos	27
5.2 - Obtención de extracto citosólico (S100) de células HeLa tratadas	28
5.3 - Obtención del extracto proteico total de células HeLa	29
5.4 - Cuantificación de proteínas	30
5.5 - Preparación de geles de acrilamida-bisacrilamida	30
5.6 - Western blot	30
5.7 - Transfección de células HeLa con el plasmidio pRL-TK	31
5.8 - Ensayo de luciferasa	32
5.9 - Análisis estadísticos	33
6 – Resultados	34
6.1 - Inducción de mal plegamiento proteico en células HeLa	34
6.2 - Impacto de la adición de análogos en la funcionalidad de la proteína luciferasa de <i>Renilla</i>	36
6.3 - Inhibición del sistema ubiquitina-proteosoma	36
6.4 - Cambios en los niveles proteicos de la histona H3 ante la exposición a análogos aminoacídicos	39
6.5 - Función del sistema ubiquitina-proteosoma en el procesamiento de la histona H3 citosólica mal plegada	42
6.6 - Respuesta de los componentes de la cascada de maduración de la histona H3 citosólica ante los análogos aminoacídicos y el inhibidor del proteosoma	43
7 – Discusión	48
8 – Conclusiones	55

9 – Bibliografía 56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cascada de procesamiento post-traducciona de las histonas H3 y H4	12
Figura 2 - Esquema de las tres principales vías de autofagia en mamíferos	16
Figura 3 - Perfil de elución de un extracto citosólico tratado con NH ₄ Cl o MG132 en una columna DEAE-5PW	17
Figura 4 - Esquema del funcionamiento del sistema ubiquitina-proteosoma	20
Figura 5 - Estructura química de los aminoácidos arginina y prolina con sus respectivos análogos	27
Figura 6 - Esquema del protocolo de fraccionamiento subcelular	29
Figura 7 - Mapa genético del plasmidio pRL-TK	32
Figura 8 - Niveles proteicos de las chaperonas de estrés térmico frente a la adición de análogos aminoacídicos durante distintos tiempos	35
Figura 9 - Actividad luciferasa en extractos de células HeLa tratadas con análogos aminoacídicos	37
Figura 10 - Respuesta proteica a la exposición a MG132	38
Figura 11 - Estructura primaria de la histona H3	40
Figura 12 - Niveles proteicos de la histona H3 citosólica ante la adición de análogos aminoacídicos	41
Figura 13 - Cambios en los niveles de histona H3 citosólica en respuesta al tratamiento con análogos y/o MG132	43
Figura 14 - Respuesta proteica de componentes de la cascada de maduración de las histonas H3 y H4 citosólicas ante distintos fármacos	45

Figura 15 - Cambios en los niveles de modificaciones post-traduccionales de las histonas

H3 y H4 recientemente sintetizadas frente a distintos tratamientos 46

ABREVIATURAS

A	Amperio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
Asf1	Proteína 1 con función anti-silenciadora
ATPasa	Adenosíntrifosfatasa
AZC	Ácido L-azetidin-2-carboxílico
BSA	Albúmina de suero bovino
CAF-1	Factor 1 de ensamblaje de la cromatina
Can	L-canavanina
CMA	Autofagia mediada por chaperona
Da	Dalton
Daxx	Proteína 6 asociada a domino de muerte
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-di-amino-tetra-acético
FBS	Suero fetal bovino
HAT	Acetiltransferasa de histona
Hsc	Proteína de choque térmico constitutiva
Hsp	Proteína de choque térmico

LAMP-2A	Proteína 2A de membrana asociada al lisosoma
LB	Luria Bertani
M	Molar
N-terminal	Amino terminal
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
NLS	Secuencia de localización nuclear
NP-40	Nonidet P-40
PAR	Poli-ADP-ribosilación
PBS	Amortiguador fosfato salino
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
PVDF	Poli-fluoruro de vinilideno
RIPA	Amortiguador del ensayo de radioinmunoprecipitación
rpm	Revoluciones <i>per</i> minuto
RbAp46	Proteína 46 asociada a retinoblastoma
SAM	S-adenosil metionina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
sNASP	Proteína espermática autoantigénica nuclear somática
SUP	Sistema ubiquitina-proteosoma
T-TBS	Amortiguador salino de Tween y Tris
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
tNASP	Proteína espermática autoantigénica nuclear testicular
Tris	Tris (hidroxi-metil) amino-metano
Tween 20	Polisorbato 20

RESUMEN

Las histonas son proteínas pequeñas con una alta carga positiva, capaces de interactuar con el ADN y ayudar en su compactación. Antes de poder ejercer esta función estas proteínas son sintetizadas en el citoplasma celular, en donde adquieren su correcto plegamiento y modificaciones post-traduccionales características por el paso secuencial a través de una serie de complejos proteicos. Pero no todas las proteínas recientemente sintetizadas adoptan su estructura nativa, y hasta un 30% de ellas son marcadas co-traduccionalmente para ser degradadas por el sistema ubiquitina-proteosoma. El objetivo de este trabajo fue dilucidar la función que cumple este mecanismo proteolítico enfrentado a una población de histonas H3 citosólicas mal plegadas. Para esto se trabajó con dos análogos aminoacídicos, AZC y Can, inductores del mal plegamiento, además de MG132, un inhibidor del proteosoma.

Mediante técnicas de fraccionamiento subcelular se obtuvo el extracto citosólico y se demostró la acumulación de la histona H3 cuando se inhibe la subunidad 20S del proteosoma en paralelo a la inducción del mal plegamiento. Con estos resultados se concluyó que, al utilizar análogos de aminoácidos que inducen mal plegamiento proteico, las histonas recientemente sintetizadas se degradan por la vía ubiquitina-proteosoma.

Trabajos a futuro debiesen enfocarse en investigar la potencial participación de otros mecanismos de degradación para esta proteína.

ABSTRACT

Histones are small highly positive charged proteins, capable of interact with the DNA to assist in its compaction. Before being able to exert this function, these proteins are synthesized in the cellular cytoplasm and then sequentially associate with different protein complexes to acquire their correct conformation and to establish their characteristic post-translational modifications. But not all newly synthesized proteins succeed in acquiring their native structure, indeed, up to 30% of them are marked to be degraded by the ubiquitin-proteasome system. We focus our study on understand the participation of this proteolytic mechanism when faced to a population of cytosolic misfolded histone H3. To this end we worked with two amino acid analogues, AZC and Can, whose presence increases the amount of aberrant proteins, in addition to MG132, a proteasome inhibitor.

By using subcellular fractionation techniques, the cytosolic extract was isolated and we demonstrated that the proteasomal 20S subunit inhibition, together with the induction of the misfold, led to a significant accumulation of the histone H3. With this, we established the participation of the ubiquitin-proteasome system in the degradation of the newly synthesized histone H3 in conditions of induced misfolding. Future work should investigate the potential participation of other degradation mechanisms for this protein.

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 – Histonas y su función a nivel celular

En un organismo eucarionte la longitud total de su material genético supera su diámetro celular. Por esto la compactación del ADN se hace necesaria y esta función recae sobre las histonas. Las histonas son proteínas de bajo peso molecular, de entre 10 y 16 kDa, altamente conservadas en eucariontes y con una marcada presencia, en su estructura primaria, de argininas y lisinas, dos aminoácidos básicos que les confieren una alta carga positiva [1]. Su función de empaquetamiento la efectúan ensamblándose en un octámero, formado por 2 copias de cada histona “core”: H3, H4, H2A y H2B. Sobre esta estructura nuclear se pliegan 147 pares de bases de ADN, dando lugar al nucleosoma, la unidad base de la cromatina [2].

El acceso al material genético de distintas maquinarias partícipes de su transcripción, traducción y reparación, entre otros procesos, es regulado por el dinamismo estructural de la cromatina [3]. Como esta está conformada en gran medida por histonas, las modificaciones post-traduccionales y/o la presencia de ciertas isoformas de estas proteínas pueden facilitar o dificultar el paso de los complejos, tanto de forma local como global [4]. Las histonas ensambladas en la cromatina presentan una gran cantidad de modificaciones post-traduccionales, principalmente en su extremo N-terminal. Estas modificaciones pueden variar en tipo (metilación, fosforilación, acetilación, entre otras), grado (mono, di, tri, etc.) y también en el aminoácido en el que se sitúan [5], y un gen verá variada su expresión según la que se encuentre presente en cierto momento en la histona. Un ejemplo de esto ocurre con la presencia, en el promotor, de la trimetilación de la lisina 4 (K4me3) o de la lisina 27 (K27me3) en la histona H3 ya que, mientras la primera activa la transcripción [6], la segunda

la reprime [7]. Es importante señalar que no hay una relación inequívoca entre marca y efecto, sino que esto depende de la ubicación génica y del entorno que rodee a la modificación pudiendo encontrarse, para una misma marca, información contradictoria respecto a su impacto en la expresión [8]. Además de esto, la presencia de modificaciones puede alterar el reclutamiento de distintas maquinarias, la interacción entre histonas o la de estas con el ADN e, inclusive, la unión de estas proteínas básicas con sus chaperonas específicas [4, 7].

1.2 – Procesamiento celular de histonas recientemente sintetizadas

Luego de la síntesis de las histonas en los ribosomas del citoplasma, estas proteínas son translocadas al núcleo y finalmente depositadas en la cromatina, siempre asistidas por distintas chaperonas. En base a esto podemos dividir las histonas en 3 grupos, según su localización celular: histonas citosólicas; nucleares no nucleosomales y nucleosomales.

Para las histonas citosólicas H3 y H4 se ha descubierto - tanto en levaduras como en un modelo de células HeLa asincrónicas - que, antes de ser translocadas al núcleo, estas proteínas atraviesan de forma secuencial por una serie de complejos en los cuales adquieren su correcto plegamiento y modificaciones post-traduccionales características, en una especie de “cascada de maduración” para las histonas (Figura 1) [9, 10]. Luego de su síntesis proteica, H3 y H4 forman los dos primeros complejos de seis, uniéndose por separado a chaperonas de la familia de estrés térmico. Mientras H3 interacciona con Hsc70 (complejo Ia), H4 lo hace con Hsp70 y Hsp90 (complejo Ib).

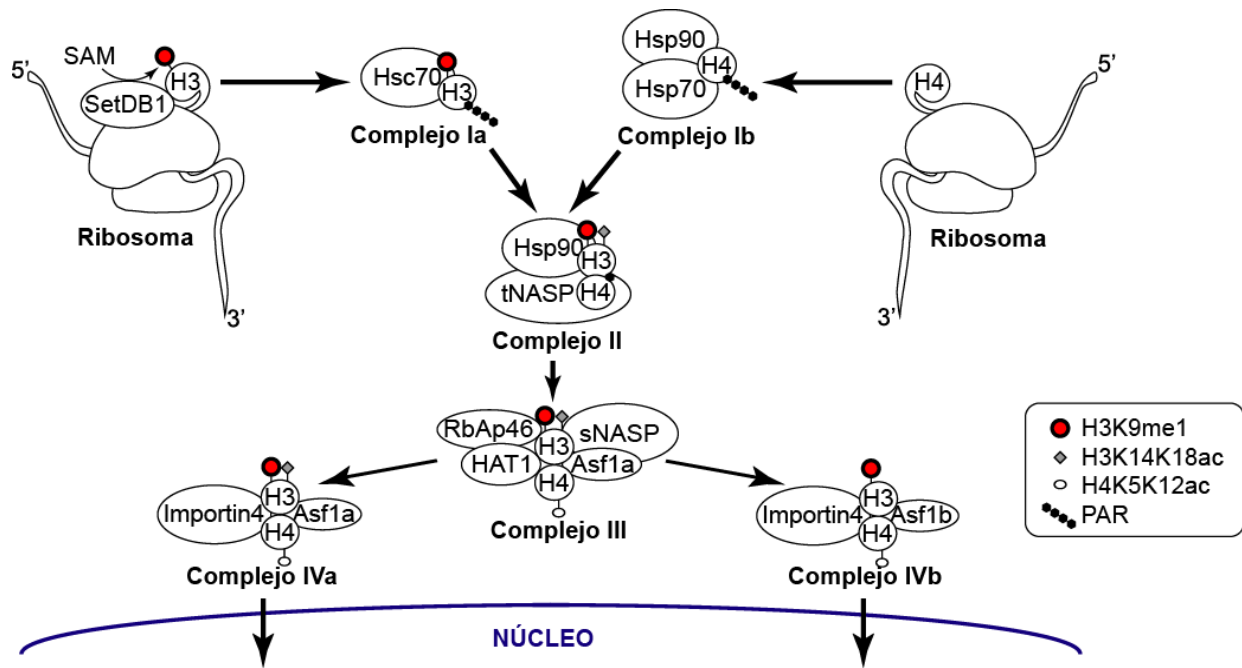


Figura 1 - Cascada de procesamiento post-traduccional de las histonas H3 y H4. Se indican las proteínas involucradas en el proceso, desde la síntesis de histonas en el ribosoma hasta su translocación al núcleo, además de modificaciones características de H3 y H4 sintetizadas *de novo*. Adaptado de [10].

En ambas proteínas se encontró una de las primeras modificaciones post-traduccionales, la poli-ADP ribosilación (PAR) que, a lo largo de la cascada de maduración, se irá perdiendo gradualmente. En el caso de H3 también está presente, en aproximadamente un 30% de ellas [11], la monometilación de la lisina 9 (H3K9me1), marca que se establece co-traduccionalmente por acción de la enzima metiltransferasa SetDB1 asociada al ribosoma [12]. En el complejo II por primera vez interaccionan las histonas H3 y H4. Aquí también aparece tNASP (del inglés *Nuclear autoantigenic sperm protein*), una de las dos isoformas de esta chaperona específica para histonas, y se mantiene desde los complejos anteriores la

presencia de Hsp90. Junto con la caída en los niveles de PAR en ambas histonas, se observa la acetilación de la histona H3 en la lisina 14 (H3K14ac). Ya en el complejo III, todas las chaperonas involucradas son específicas para histonas (sNASP, y Asf1a - del inglés *Anti-silencing function protein 1*), además de encontrarse el complejo HAT-B (formado por HAT1 y RbAp46). Respecto a las modificaciones aparecen dos nuevas en H4, la acetilación de las lisinas 5 y 12 (H4K5K12ac) además de la pérdida total de la poli-ADP ribosilación en ambas histonas. Al término de la cascada se generan dos complejos IV, similares en la presencia de Importina-4, pero diferentes según la isoforma de Asf1 involucrada. En el complejo IVa se encuentra Asf1a mientras que la otra isoforma de esta chaperona, la b, está presente en el complejo IVb. Otra diferencia entre ambos es que, en este último complejo, H3 presenta menores niveles de la marca de acetilación en la lisina 14, los que se mantienen en el complejo IVa. Luego de todo este procesamiento, Importina-4 reconoce la secuencia NLS (del inglés *Nuclear Localization Signal*) presente en el extremo amino terminal de las histonas y así el dímero H3-H4 es translocado al interior del núcleo [13].

Aunque las modificaciones post-traduccionales presentes en las histonas recientemente sintetizadas son pocas comparadas con las presentes en las histonas nucleares, tienen una gran importancia para procesos posteriores [11]. Por ejemplo H4K5K12ac promueve la translocación nuclear de esta histona [10]; o la marca H3K9me1, que favorece la posterior trimetilación de este residuo cuando la histona H3 ingresa al núcleo, y en este estado se convierte en una marca característica de heterocromatina constitutiva [14].

1.3 – Regulación de los niveles proteicos de la histona

Las células, a lo largo de toda su vida, mantienen un férreo control sobre su proteoma ya que un mínimo desbalance en los niveles proteicos puede acarrear grandes dificultades. Este equilibrio lo mantienen actuando tanto a nivel de los ARN mensajeros, regulando su producción y degradación, como de forma traduccional y post-traduccional sobre las proteínas.

Si hablamos de histonas, tanto un exceso como una falta de ellas genera un escenario celular altamente nocivo, con una alta citotoxicidad, inestabilidad cromosómica y una mayor sensibilidad del material genético al daño, lo que finalmente torna inviable a la célula [15, 16]. Para las histonas podemos encontrar puntos de regulación en todas las etapas de su síntesis, por ejemplo sus promotores se activan fuertemente gracias a la unión de distintos factores en esa zona, principalmente previo a la fase S del ciclo celular, cuando hay una gran demanda de histonas previo a la replicación del ADN. Por su parte, el control post-traduccional de sus niveles involucra la degradación de la proteína [16] y también a las chaperonas específicas de histonas que, a su vez, son reguladas en su unión por las modificaciones post-traduccionales presentes en sus mismas proteínas blanco [4].

1.3.1 – Acción de chaperonas específicas de histonas

Las chaperonas son proteínas que asisten, tanto en su plegamiento como en su degradación, a una amplia gama de macromoléculas gracias a su capacidad de unirse de forma general o específica a distintos blancos. Para las histonas existen chaperonas específicas como Asf1 y NASP que forman parte de los complejos de maduración de H3

citoplasmática (Figura 1), o como CAF-1, HIRA y Daxx que se ubican en el núcleo y se unen a dímeros de H3-H4, asistiendo su deposición en la cromatina [17]. Las chaperonas son fundamentales ya que las histonas siempre se movilizan asociadas a ellas, ya sea en su camino al núcleo (desde el citoplasma hasta la cromatina misma) o hacia su degradación (luego de desensamblarse del nucleosoma o al no lograr plegarse correctamente) [18, 19]. Pero, como se nombró previamente, esta no es la única forma de regulación de los niveles de histonas solubles. Mecanismos de degradación proteica, tales como la autofagia y el sistema ubiquitina-proteosoma, también participan en esta tarea.

1.3.2 – Degradación mediante la autofagia mediada por chaperonas

La autofagia se divide en 3 grandes grupos: macroautofagia, microautofagia, y autofagia mediada por chaperona (CMA, del inglés *Chaperone-Mediated Autophagy*) (Figura 2). El primero de estos se considera un mecanismo no selectivo de degradación ya que el autofagosoma, al formarse, captura todo lo que esté en sus cercanías sin discriminar entre lípidos, proteínas, organelos u otros, para luego fusionarse con un lisosoma y degradar todo su contenido gracias a la acción de las diversas enzimas presentes dentro de esta vesícula membranosa [20].

Por su parte, en la microautofagia, es el mismo lisosoma el que se invagina para degradar posteriormente lo que capture en este proceso, ya sea de forma selectiva o no [20].

Finalmente la CMA se considera una vía de degradación autofágica selectiva ya que sus blancos presentan un motivo KFERQ en su secuencia, lo que permite su reconocimiento por la chaperona Hsc70, que los dirige hacia el lisosoma. Ya ahí este complejo

chaperona/proteína blanco interactúa con la proteína de membrana LAMP-2A, que opera como receptor. Esta misma multimerizará para formar un poro que será estabilizado por Hsp90, el que permitirá el paso, asistido por una Hsc70 lisosomal, de la proteína blanco hacia el interior del lisosoma [20].

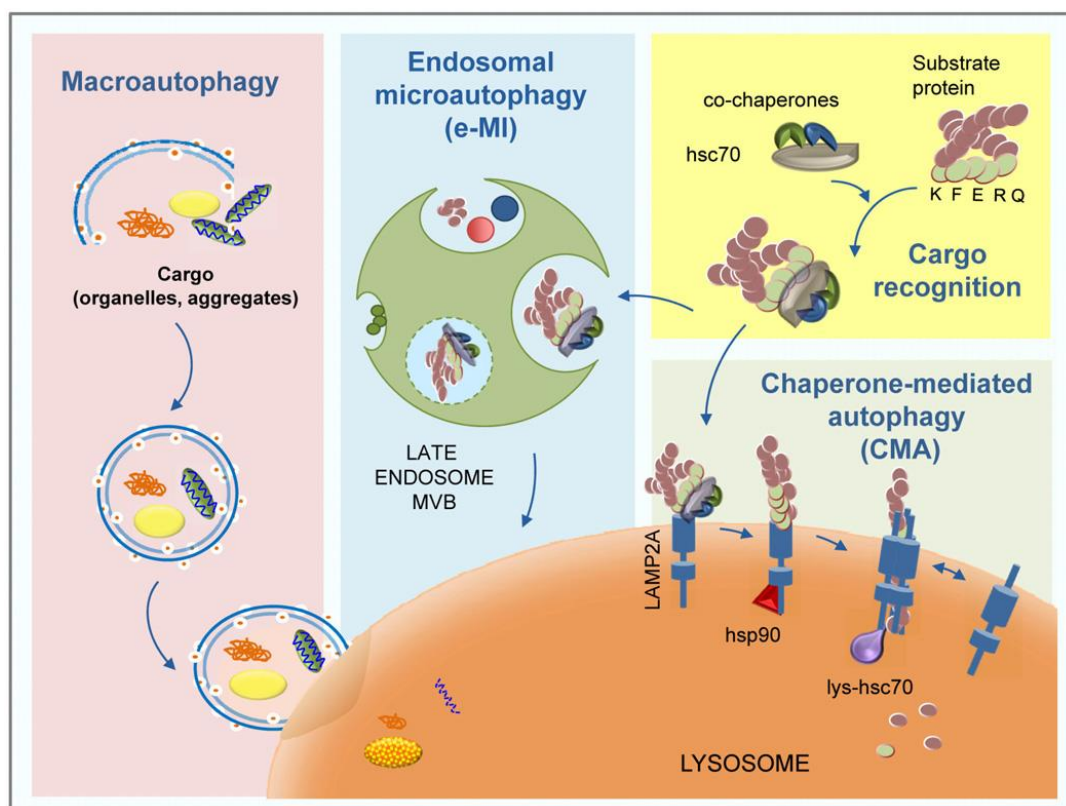


Figura 2 - Esquema de las tres principales vías de autofagia en mamíferos. Se muestra un bosquejo del funcionamiento de la macroautofagia, la microautofagia y de CMA, indicándose en esta última los factores más relevantes en el proceso. Adaptado de [21].

El grupo de la Dra. Almouzni sugirió la participación de la CMA, y una mínima participación del proteosoma, en la degradación de un exceso de histonas solubles causado por el silenciamiento de NASP en un modelo de células HeLa [22].

Sumado a esto, en la tesis de Germán Púas realizada en nuestro laboratorio [23] se estudió el perfil de elución, en una columna de intercambio iónico, de la histona H3

citoplasmática, comparando el control con un extracto tratado con cloruro de amonio (NH_4Cl), un inhibidor de la autofagia. Se observa que en la muestra con NH_4Cl la histona H3 eluye en un rango salino más acotado, tendiendo hacia las concentraciones en las que aparece el complejo II (Figura 3B) mientras que, en el control (Figura 3A), la histona se distribuye en todos los complejos de maduración, sugiriendo un reordenamiento de estos cuando la autofagia se ve inhibida.

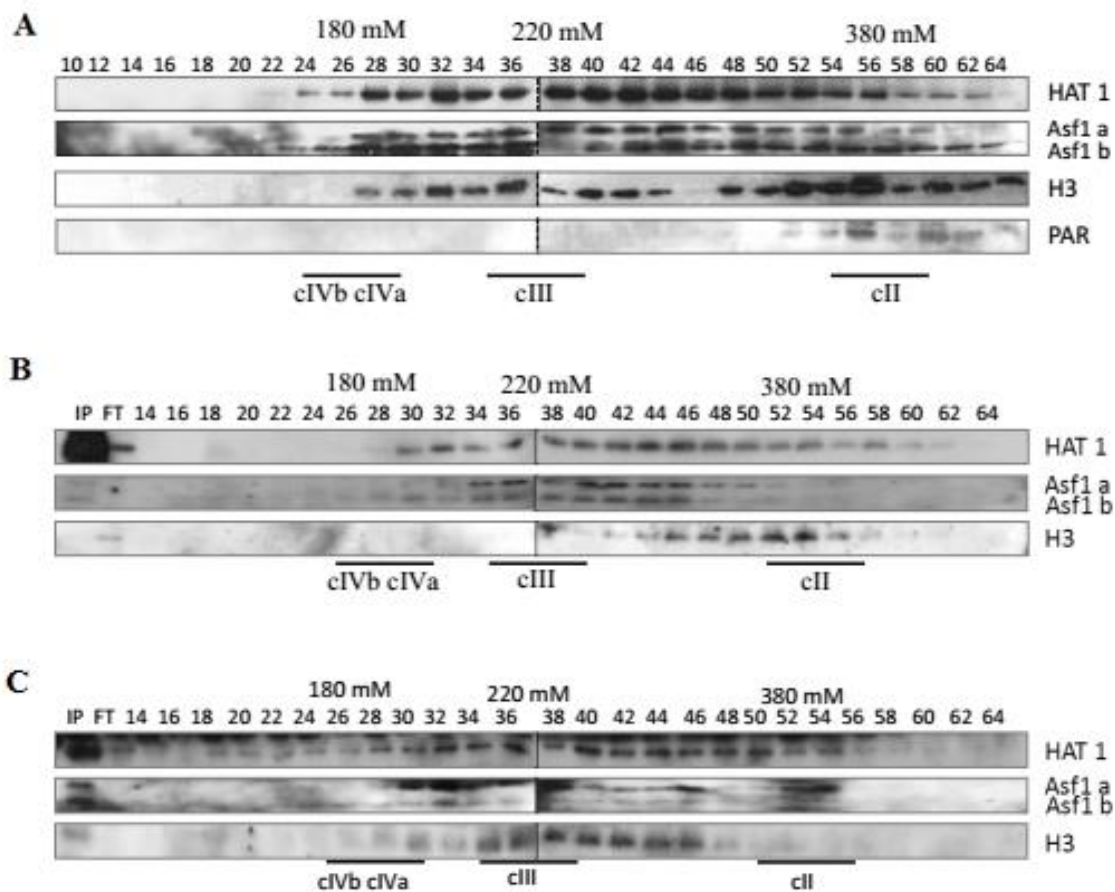


Figura 3 - Perfil de elución de un extracto citoplasmático tratado con NH_4Cl o MG132 en una columna DEAE-5PW. (A) Distribución normal de las proteínas derivadas de un extracto citoplasmático de células HeLa (control). (B) Patrón de elución de H3 y otras proteínas desde un extracto citoplasmático de células HeLa tratado con NH_4Cl o (C) MG132. Adaptado desde la tesis de Germán Púas [23].

También existen datos *in silico* sin publicar del laboratorio que indican la existencia en la histona H3 de dos motivos KFERQ, uno putativo y otro consenso, señalándola como un potencial blanco de la vía CMA.

Todo esto sugiere una participación de la autofagia, específicamente de la autofagia mediada por chaperonas, en la regulación de los niveles proteicos de la histona H3 citosólica.

1.3.3 – Degradación mediante el sistema ubiquitina-proteosoma

El otro mecanismo de degradación proteica corresponde al sistema ubiquitina-proteosoma (SUP), que también participa en el control de la calidad del proteoma de diversos organismos eucariontes [24]. Este último punto hace referencia tanto a proteínas solubles que en condiciones fisiológicas o patológicas presenten algún grado de daño o mal plegamiento en su estructura, como a las que se están sintetizando *de novo*. La constante vigilancia llevada a cabo por este sistema es apoyada por chaperonas que, aparte de actuar en el (re)plegamiento de la proteína, la acompañan hacia su degradación cuando el daño es irreversible [25].

El proteosoma degrada, principalmente, proteínas unidas de forma covalente a varias copias de la ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos, y esto ocurre mediante tres reacciones enzimáticas secuenciales que se repiten en forma cíclica. La primera enzima (E1) se une a la ubiquitina y luego la pasa a E2, la segunda enzima involucrada que será la que finalmente conjugará este polipéptido a la proteína a degradar. Tanto E2 como el blanco de degradación son reconocidos por la tercera enzima del proceso (E3), generándose de esta

forma la cercanía necesaria para la formación del enlace covalente proteína-ubiquitina (Figura 4A) [26, 27].

Este complejo proteico (26S) tiene una estructura tipo barril que consta de una subunidad central 20S con diversas actividades catalíticas, rodeada por dos copias de la subunidad 19S con funciones regulatorias. La subunidad 19S cumple funciones de reconocimiento de la proteína blanco y de remoción de las cadenas de ubiquitina que la marcan como tal, además de ser la encargada de desplegarla (tiene actividad ATPasa) y de asistir su ingreso al proteosoma. En la parte central de la subunidad 20S se encuentran las actividades proteolíticas de este sistema, en donde se realizan cortes similares a los de la quimiotripsina, tripsina y caspasas (Figura 4B) [26, 28].

Dentro de los muchos blancos de este sistema podemos encontrar proteínas de vida media corta [29] como p53 [30], Ciclina D1 [31], c-Myc [32], entre otras. Las histonas asociadas a la cromatina son proteínas estables con una vida media de meses [33], por lo que quedarían fuera de los potenciales blancos de este sistema, pero esto cambia si nos referimos a las histonas solubles no incorporadas a la cromatina, en las cuales este parámetro alcanza un valor promedio de 30 minutos en levaduras [34]. El trabajo del proteosoma abarca tanto la degradación de proteínas antiguas que presenten problemas en su plegamiento [24], como la de proteínas recientemente sintetizadas, proclives al mal plegamiento y a la agregación [35], actuando como un control de calidad para estas. Esta revisión de las proteínas sintetizadas *de novo* ocurre de forma co-traducciona l en el ribosoma, con hasta un 30% de ellas siendo marcadas para degradación en condiciones normales [36].

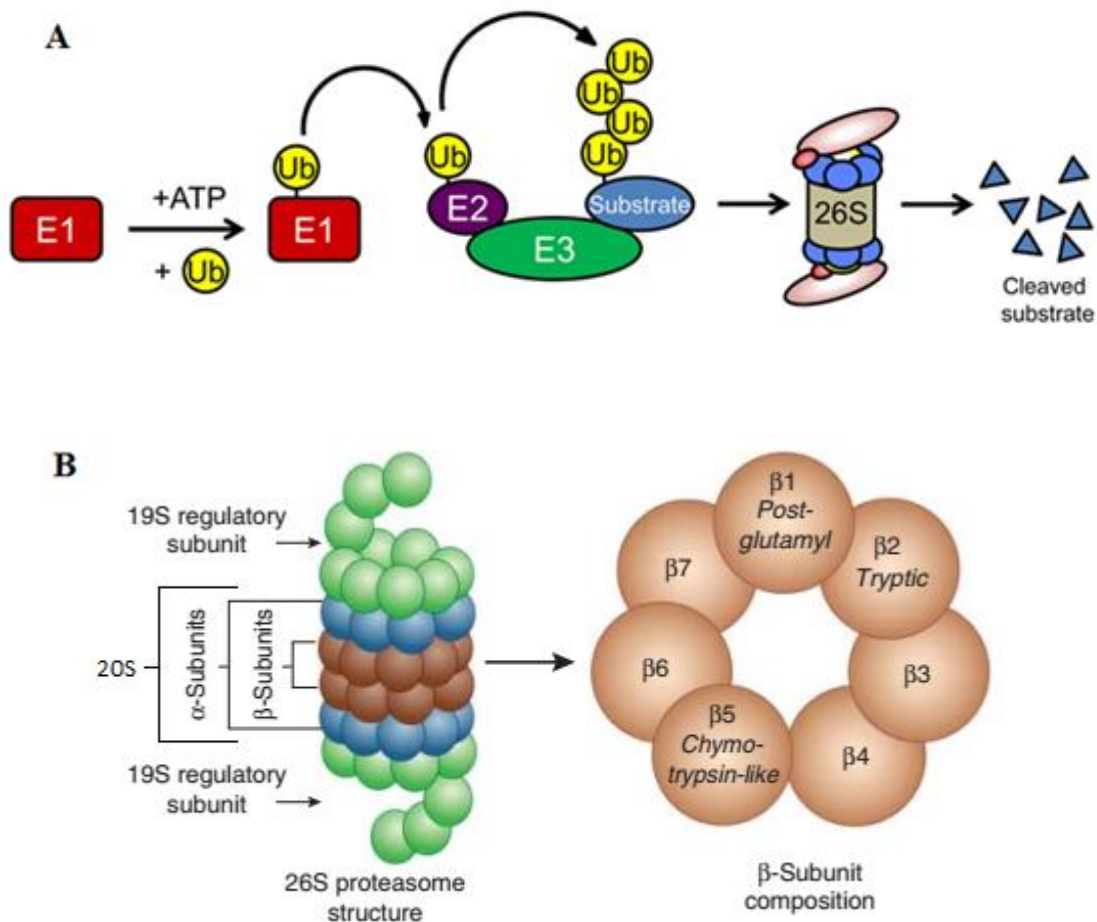


Figura 4 – Esquema del funcionamiento del sistema ubiquitina-proteosoma. (A) Secuencia de reacciones enzimáticas que llevan a la conjugación de la proteína blanco con ubiquitina, para su posterior proteólisis. Tomado de [27]. **(B)** Arquitectura del complejo multiproteico 26S. Adaptado de [28]

Como se nombró anteriormente, la mayoría de los blancos de degradación del proteosoma son reconocidos por su conjugación con varias copias de ubiquitina. Aunque menos común, el reconocimiento de los blancos también puede darse de forma independiente de esta proteína gracias a la presencia ciertos motivos desestructurados, o con ayuda de otras señales celulares [37]. Para la degradación de histonas se han observado diversas opciones,

desde un exceso de histonas en levadura siendo degradado por el proteosoma en un mecanismo dependiente de fosforilación y poliubiquitinación [16, 34], como una degradación proteosomal dependiente de la acetilación de las histonas “core” [38]. Es importante mencionar que el primer caso no nos permite descartar la participación de la CMA, ya que las levaduras no presentan un sistema de degradación análogo a este.

Sumado a esto, en la tesis de Germán Púas también se trabajó con el inhibidor del proteosoma MG132 y este, al igual que la adición de NH_4Cl , genera una redistribución de los peaks de elución de la H3 citosólica respecto al control, aunque en este caso hacia los complejos III y IV (Figura 3C) [23].

Sabiendo que la histona es capaz de ser degradada de distintas formas por el proteosoma, que la subpoblación citosólica de la histona posee una vida media corta, y que el SUP es fundamental para controlar la calidad de las proteínas sintetizadas *de novo*, este trabajo propone investigar si el mal plegamiento de la histona H3 citosólica la convierte en un blanco de degradación para el sistema ubiquitina-proteosoma, en un modelo de células HeLa.

2 - HIPÓTESIS

La histona H3 citosólica mal plegada es degradada por el sistema ubiquitina-proteosoma en un modelo de células HeLa.

3 – OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la participación del sistema ubiquitina-proteosoma en la proteólisis de la histona H3 citosólica mal plegada en un modelo de células HeLa.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la adición de análogos de aminoácidos en los niveles proteicos de la histona H3 citosólica en células HeLa.
2. Analizar los cambios en los niveles proteicos de histona H3 citosólica, modificaciones y distintos componentes de sus complejos de maduración, en condiciones de inhibición del sistema ubiquitina-proteosoma e inducción del mal plegamiento.

4 - MATERIALES

4.1 - Anticuerpos primarios y secundarios

Anticuerpo					
Primario	Dilución	Código	Secundario	Dilución	Código
Asf1a/b	1:1000	Donado por la Dra. Geneviève Almouzni, Instituto Curie, Francia	Conejo	1:5000	611-7302, Rockland
β -Tubulina	1:5000	ab6046, Abcam	Conejo	1:5000	
Ciclina B1	1:1000	4138, Cell Signaling	Conejo	1:5000	
HAT1	1:1000	ab12164, Abcam	Conejo	1:5000	
Histona H3	1:1000	ab1791, Abcam	Conejo	1:5000	
H3K9me1	1:1000	ab9045, Abcam	Conejo	1:5000	
H3K18ac	1:1000	ab1191, Abcam	Conejo	1:5000	
Histona H4	1:1000	ab10158, Abcam	Conejo	1:5000	
H4K12ac	1:1000	07-595, Millipore	Conejo	1:5000	
Hsp70	1:1000	4876, Cell Signaling	Conejo	1:5000	
Hsp90	1:1000	sc-7947, Santa Cruz, Biotechnology	Conejo	1:5000	
Importina-4	1:1000	ab28387, Abcam	Conejo	1:5000	
NASP	1:1000	Donado por la Dra. Geneviève Almouzni, Instituto Curie, Francia	Conejo	1:5000	
Ubiquitina	1:1000	ab7780, Abcam	Conejo	1:5000	
β -Actina	1:5000	ab3280, Abcam	Ratón	1:5000	610-1302, Rockland
p53	1:500	2524, Cell Signaling	Ratón	1:5000	
Hsc70	1:2000	ab19136, Abcam	Rata	1:5000	612-1302, Rockland

4.2 - Fármacos

Ácido L-azetidín-2-carboxílico (A0760, Sigma-Aldrich), L-canavanina (C1625, Sigma-Aldrich), MG132 (M8699, Sigma-Aldrich).

4.3 - Kits comerciales

Ensayo reportero dual de luciferasa (E1910, Promega), Midi Kit E.Z.N.A de extracción de ADN plasmidial (D6904-03, Omega Bio-Tek), Sustrato de quimioluminiscencia para *Western blot* Pierce ® ECL (32106, Thermo Fisher Scientific) y SuperSignal ® West Pico (34080, Thermo Fisher Scientific).

4.4 - Otros

Ampollas de albúmina de suero bovino estándar (23209, Thermo Fisher Scientific), Aprotinina (A1153, Sigma-Aldrich), DMEM (SH30081, GE Healthcare Life Science), Ensayo de Proteínas Coomassie (1856209, Thermo Fisher Scientific), Estándares de peso molecular preteñidos para electroforesis en gel PageRuler™ (26616, Thermo Fisher Scientific), FBS (16000044, GE Healthcare Life Science), Leupeptina (L2884, Sigma-Aldrich), L-Glutamina (SH30034, GE Healthcare Life Science), Lipofectamina® 2000 (11668-019, Invitrogen), Membrana de PVDF de 0,45 µm (88518, Thermo Fisher Scientific), Opti-MEM™ (11058021, Gibco), Placa blanca de 96 pocillos (136101, Thermo Fisher Scientific), Películas radiográficas Ortho CP-GU (EVYAU, AGFA HealthCare), Penicilina-Estreptomicina (SV30010, GE Healthcare Life Science), Pepstatina A (P5318, Sigma-Aldrich), Solución de deshibridación (21059, Thermo Fisher Scientific), Tripsina (SH30042, GE Healthcare Life Science).

4.5 - Químicos sólidos

Acrilamida (A8887, Sigma-Aldrich), Albúmina de suero bovino liofilizada (A7906, Sigma-Aldrich), PSA (2310, Calbiochem), Azul de bromofenol (AZ-0395, Winkler), Bis-acrilamida (15516-024, Invitrogen), Caldo LB (12106, Mo Bio Laboratories), Carbenicilina sal disódica

(C1100, US Biological), Cloruro de potasio (104936, Merck), Cloruro de sodio (106404, Merck), Cloruro de magnesio (105833, Merck), Desoxicolato de sodio (D6750, Sigma-Aldrich), DTT (43815, Sigma-Aldrich), EDTA (15576-028, Invitrogen), Glicina (104201, Merck), Hidróxido de sodio (106482, Merck), PBS pH 7,4 10x (70011044, Gibco), PMSF (A0999, AppliChem), Ponceau S (114275, Merck), SDS (15525-017, Invitrogen), Tris (15504-020, Invitrogen).

4.6 - Químicos líquidos

Ácido acético glacial (100063, Merck), Ácido clorhídrico fumante (100317, Merck), Azul de tripán (15250061, Thermo Fisher Scientific), β -Mercaptoetanol (444203, Calbiochem), DMSO (D8418, Sigma-Aldrich), Glicerol (4750-OP, Calbiochem), Metanol (106009, Merck), NP-40 (492016, Merck), 2-Propanol (109634, Merck), Solución fijadora de películas radiográficas (G354, AGFA HealthCare), Solución reveladora de películas radiográficas (G150, AGFA HealthCare), TEMED (110732, Merck), Tween 20 (9480-OP, Calbiochem).

4.7 – Soluciones y amortiguadores

- Amortiguador A: 10 mM Tris pH 7,9; 1,5 mM $MgCl_2$; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF.
- Amortiguador B (10x): 0,3 M Tris pH 7,9; 1,4 M KCl; 0,03 M $MgCl_2$.
- Amortiguador C: 20 mM Tris pH 7,9; 25% (v/v) Glicerol; 0,42 M NaCl; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM PMSF; 0,5 mM DTT.
- Amortiguador E: 50 mM Tris pH 7,9; 25% (v/v) Glicerol; 0,5 mM EDTA; 5 mM $MgCl_2$; 5 mM DTT; 0,2 mM PMSF.

- Amortiguador de corrida 10x: 250 mM Tris; 2 M Glicina; 1% (p/v) SDS.
- Amortiguador para gel concentrador: 0,5 M Tris pH 6,8; 0,4% (p/v) SDS.
- Amortiguador para gel separador: 1,5 M Tris pH 8,8; 0,4% (p/v) SDS.
- Amortiguador de Laemmli 5x: 0,3125 M Tris pH 6,8; 10% (p/v) SDS; 25% (v/v) Glicerol; 0,01% (p/v) Azul de bromofenol; 5% (v/v) β -Mercaptoetanol.
- Amortiguador RIPA: 20 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 1% (p/v) NP-40; 1% (v/v) Desoxicolato de sodio; 0,1% (v/v) SDS; 1 mM EDTA.
- Amortiguador de transferencia: 25 mM Tris; 0,2 M Glicina; 0,1% SDS; 20% Metanol.
- Medio DMEM suplementado: 10% (v/v) FBS; 2 mM L-Glutamina; 100 U/mL Penicilina; 100 μ g/mL Estreptomicina.
- Rojo de Ponceau: 5% (p/v) ácido acético; 0,1% (p/v) Ponceau S.
- Solución acrilamida-bisacrilamida: 30% (p/v) acrilamida; 0,8% (p/v) bisacrilamida.
- Solución de bloqueo: 1% (p/v) de BSA liofilizada ó 5% (p/v) de Leche descremada en T-TBS 1x.
- Tripsina: 0.025% (v/v) en PBS 1x.
- T-TBS 10x: 200 mM Tris pH 7,4; 1,5 M NaCl; 1% (v/v) Tween 20.

5 - MÉTODOS

5.1 - Tratamiento de las células HeLa con distintos fármacos

El crecimiento y mantención de las células HeLa se realizó en medio DMEM suplementado, a 37°C y con 5% de CO₂. Para los tratamientos se sembró, 24 horas antes, un número inicial de 1,2x10⁶ células en placas p100. Al otro día, con una confluencia celular entre 60 y 70%, se adicionó sobre las células 5 mM de los fármacos ácido L-azetidín-2-carboxílico (AZC) o L-canavanina (Can) (Figura 5) - resuspendidos en agua bidestilada -, para inducir el mal plegamiento proteico, o solo su solvente como control, por 3, 3½ y 4 horas. Diez minutos antes de cumplirse estos tiempos se adicionó, de ser necesario, MG132 a una concentración final de 10 µM, o DMSO como control.

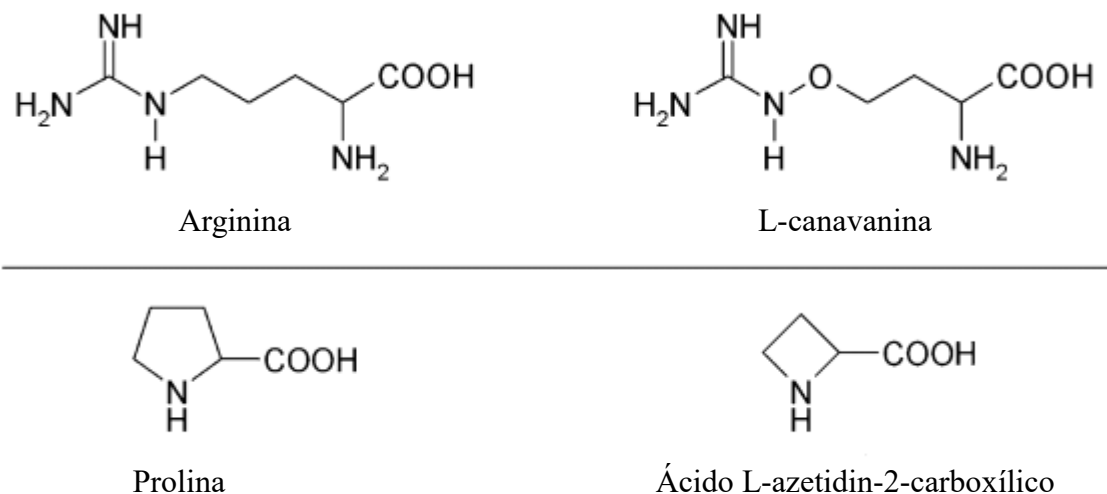


Figura 5 – Estructura química de los aminoácidos arginina y prolina con sus respectivos análogos. A la derecha de los aminoácidos se muestran sus correspondientes análogos no proteicos, los que competirán con estos para ser incorporados a las proteínas en síntesis.

5.2 - Obtención de extracto citosólico (S100) de células HeLa tratadas

Luego de someter a las células al tratamiento indicado en 3.1, y siguiendo un protocolo de fraccionamiento subcelular ya establecido [39] y esquematizado en la Figura 6, se separó el citosol, el extracto nuclear y el pellet de las células. Para esto a las células HeLa se les retiró el medio DMEM, se las lavó dos veces con PBS 1x, y se tripsinizaron por 5 minutos a 37°C. De lo recolectado, 5 µL se usaron para verificar con azul de tripán la viabilidad celular posterior a los tratamientos, mientras que el resto se centrifugó a 2.300 rpm por 5 minutos. El sedimento se lavó dos veces con PBS 1x, y se mantuvo a 4°C hasta el final del protocolo.

El sedimento se resuspendió en 5 volúmenes del amortiguador hipotónico A, y se dejó en el por 10 minutos para luego centrifugar esa suspensión por 10 minutos a 10.000 rpm, siempre en frío. El sobrenadante se descartó y al sedimento se le adicionó 2 volúmenes del mismo amortiguador A. La suspensión generada se trasvasó a un homogeneizador manual del tipo Dounce con mortero B para su ruptura mecánica, bajando 10 veces el émbolo del sistema.

El homogeneizado obtenido se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 10.000 rpm y, luego de esto, el sobrenadante y el sedimento se sometieron a distintos tratamientos. Mientras el primero se mezcló con 0,1 volúmenes de amortiguador B, y se centrifugó por 1 hora a 13.300 rpm para finalmente obtener el sobrenadante (S100); al segundo se le adicionó 1 volumen de amortiguador C, se agitó por 30 minutos a 4°C y luego se centrifugó a 13.300 rpm por 30 minutos más. Es de este que se obtienen tanto el extracto nuclear (sobrenadante), como la cromatina (sedimento, resuspendido en amortiguador E).

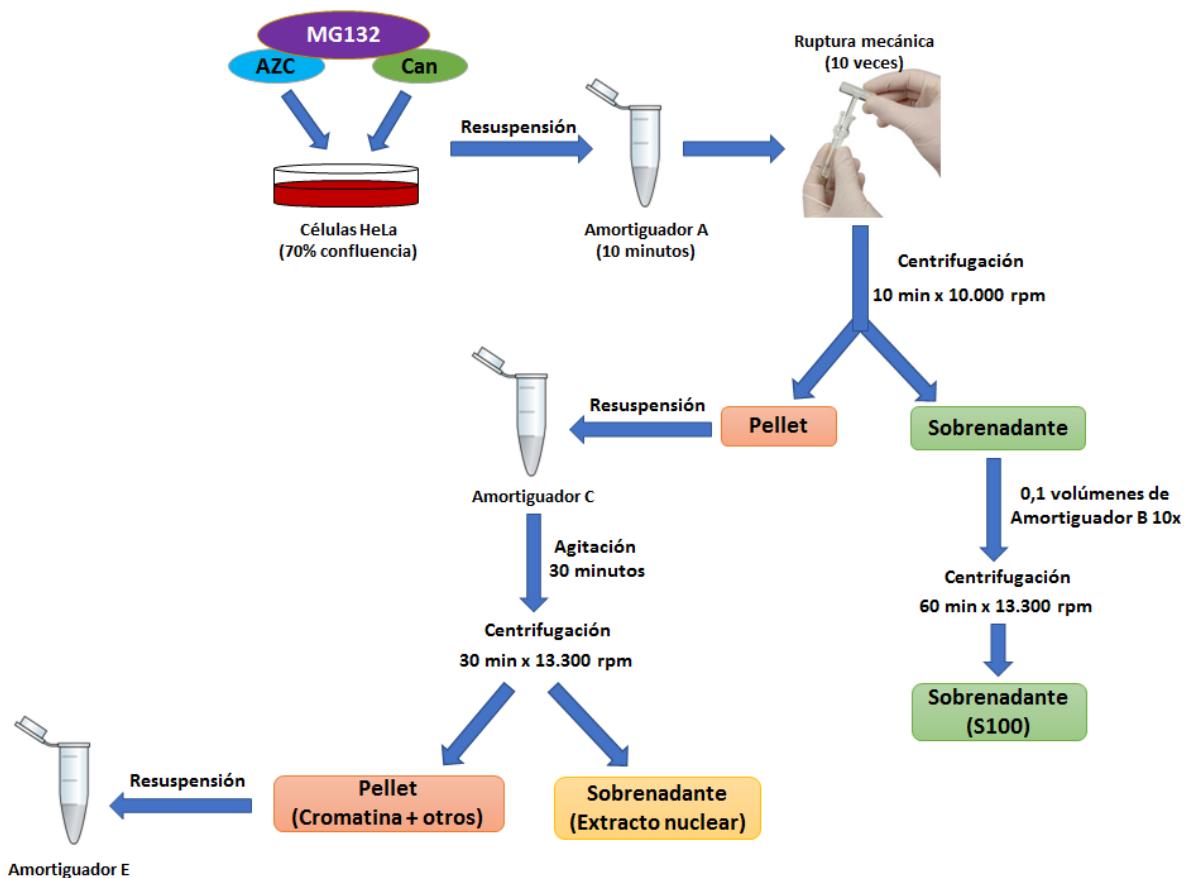


Figura 6 – Esquema del protocolo de fraccionamiento subcelular. Se señalan de forma simplificada los pasos a seguir para la obtención del extracto citosólico, el nuclear y el pellet luego de la ruptura mecánica de las células, utilizando distintos amortiguadores para esto y trabajando siempre en frío.

5.3 - Obtención del extracto proteico total de células HeLa

Repetiendo lo realizado en la primera parte del punto 5.2, en este caso al sedimento obtenido se adicionó 1 volumen de Amortiguador RIPA, complementado con los inhibidores de proteasas: leupeptina, aprotinina y pepstanina A, a una concentración final de 10 µg/mL. El sedimento se resuspendió y agitó por 30 minutos a 4°C. Para finalizar se centrifugó la mezcla a 13.300 rpm por 30 minutos, siendo el sobrenadante la muestra de interés.

5.4 - Cuantificación de proteínas

La concentración de las muestras obtenidas, tanto por RIPA como con el homogeneizador manual, se determinó mediante el método de Bradford [40]. Brevemente, se mezclaron 250 μL del reactivo de Bradford con un estándar de BSA (de 0 a 10 μg), o con las muestras de interés, para luego proceder con la medición de absorbancia a 595 nm en un lector multi-modal Synergy H1.

5.5 - Preparación de geles de acrilamida-bisacrilamida

Se usaron vidrios de 1,5 mm de espesor y peinetas de 15 pocillos para preparar geles de acrilamida-bisacrilamida de un 4% (p/v) en su región concentradora, y de concentración variable para la zona separadora, dependiendo de la proteína de interés (8%, 10%, 12,5% o en gradiente de 6% a 20% (p/v)). Se usó persulfato de amonio (PSA) y N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED) para su polimerización.

5.6 - Western blot

Se mezclaron los volúmenes necesarios de muestra con 5 μL de amortiguador Laemmli 5x, para completar un volumen final de 25 μL . La muestra se desnaturó por 5 minutos a 100°C, para luego ser cargada en el gel correspondiente, usando 7 μL del estándar de proteínas comercial. La corrida se realizó a temperatura ambiente, utilizando amortiguador de corrida 1x y un voltaje inicial de 80 V, el cual se aumentó a 100 V cuando las muestras pasan al gel separador.

Al terminar la corrida, el gel se puso en contacto estrecho con una membrana de PVDF activada previamente con metanol 100%. Esto luego se sumergió en amortiguador de

transferencia 1x, con el paso de las proteínas del gel a la membrana realizándose en frío, exponiéndolas por 90 minutos a un amperaje constante de 400 mA.

Finalmente, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para comprobar la correcta transferencia, y luego se destiñó con metanol 100%, para posteriormente ser traspasada a una solución de bloqueo en la que se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Al cumplirse este tiempo la membrana se incubó con el anticuerpo primario de interés durante toda la noche a 4°C, en agitación (Punto 4.1).

Al día siguiente la membrana se lavó 3 veces por 5 minutos con T-TBS 1x para sacar cualquier exceso de anticuerpo primario, y luego se incubó por 1 hora (en agitación) con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 5000 veces (Punto 4.1). Para finalizar, se lavó nuevamente 3 veces por 5 minutos con T-TBS 1x y luego se reveló, en oscuridad, con ayuda de los distintos kits de luminiscencia, líquidos y películas radiográficas.

5.7 - Transfección de células HeLa con el plasmidio pRL-TK

Para empezar se crecieron bacterias competentes *Stellar*, las que tienen incorporado el plasmidio pRL-TK que codifica para la proteína luciferasa (Figura 7), en medio LB con una concentración final de 100 µg/mL de ampicilina a 37°C, por 16 horas en agitación. Luego de este tiempo se utilizó el kit Midi para lisar las bacterias y aislar el ADN plasmidial, concluyendo con la medición de su concentración en un equipo NanoDrop 2000.

Se sembraron 7.500 células HeLa en una placa blanca de 96 pocillos, y se dejaron crecer por 24 horas. Al día siguiente se prepararon por separado mezclas de 100 ng de ADN (o el volumen correspondiente de agua bidestilada) ó 0,3 µL de Lipofectamina 2000 con Opti-MEM, las que luego se mezclaron y se dejaron reposar por 30 minutos. La solución final se adicionó a los pocillos de la placa. Cinco horas después este líquido se retiró y se

reemplazó por medio DMEM fresco para recuperar a las células y, al cumplirse 24 horas desde la transfección, se les adicionó por 3 horas AZC o Can.

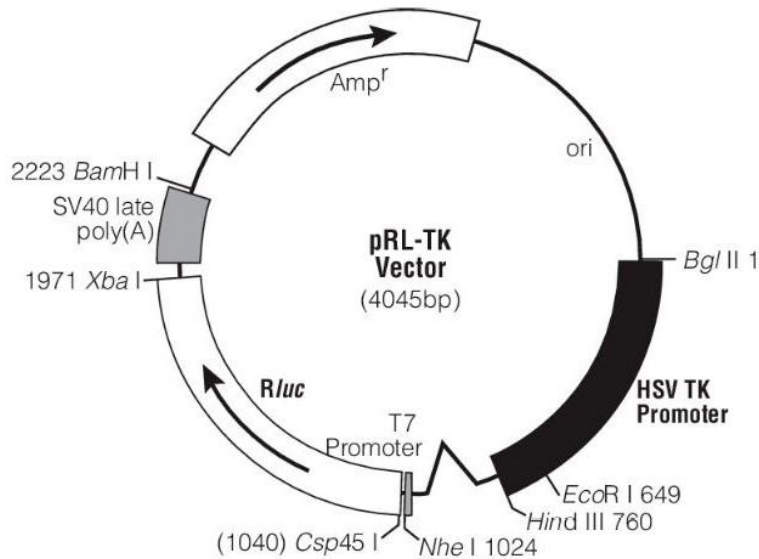


Figura 7 – Mapa genético del plasmidio pRL-TK. En la imagen se indican genes, promotores, sitios de corte y otras zonas características del plasmidio utilizado.

5.8 - Ensayo de luciferasa

Luego de la transfección y la exposición de las células a los análogos, y siguiendo las indicaciones del fabricante, se descartó el medio de las células tratadas, se lavó 2 veces cada pocillo con PBS 1x frío, y se adicionó sobre ellas 20 μ L del amortiguador de lisis proporcionado en el kit. La placa se agitó a temperatura ambiente por 15 minutos y luego, sobre la suspensión obtenida, se adicionó rápidamente 100 μ L de una mezcla con los sustratos necesarios para que la luciferasa de *Renilla* catalice la oxidación de Coelenteracina en Coelenteramida, con la consiguiente emisión de luz como subproducto de la reacción.

5.9 – Análisis estadísticos

Según lo que se quisiera comparar, los experimentos se analizaron con distintos test estadísticos. Los Western blot se cuantificaron con el programa ImageJ, se normalizaron contra β -actina y el control se igualó a 1 para facilitar la comparación. Se realizó un ANOVA de 1 vía y el post-test de Dunnett, con un $p < 0,05$ para todos los casos. Junto al gráfico correspondiente se muestra un resultado representativo del experimento.

Para el ensayo de luminiscencia de la luciferasa, se restó la emisión lumínica basal a cada muestra, el control se llevó al 100% y sobre esto se realizó un t de student, con un $p < 0,0001$ para cada fármaco.

6 - RESULTADOS

6.1 – Inducción de mal plegamiento proteico en células HeLa

Se trabajó con análogos aminoacídicos, inductores de mal plegamiento proteico, para generar una mayor población de proteínas mal plegadas y facilitar el estudio de esta condición. Al tener alta similitud estructural con los aminoácidos regulares, con diferencias de entre 1 a 2 átomos respecto a ellos (Figura 5), pueden y son incorporados a las proteínas en síntesis pero ciertas interacciones moleculares se pierden, lo que repercute en la estructura final adoptada por ellas. El primero de estos análogos es el ácido L-azetidín-2-carboxílico (AZC), que posee una estructura similar a la prolina, y el segundo la L-canavanina (Can), semejante a la arginina. Estos se adicionaron a una concentración final de 5 mM al medio de cultivo de las células HeLa por distintos períodos de tiempo. Para comprobar su efecto se estudiaron, mediante Western blot, los niveles proteicos de las chaperonas Hsp70 y Hsp90 citosólicas. Se escogieron estas dos proteínas ya que, ante un aumento en la cantidad de proteínas con problemas de plegamiento, estas responden incrementando sus niveles [41, 42]. El resultado se contrastó con el de células no tratadas, usando β -actina como control de carga puesto que, al ser una proteína de vida media larga, sus niveles no alcanzarán a verse afectados en las horas de tratamiento [43]. Al adicionar AZC al medio las chaperonas Hsp70 y Hsp90, en ambos experimentos mostrados, respondieron con cambios cíclicos en sus niveles, con aumentos sucedidos por caídas a lo largo de los distintos tiempos de exposición al análogo. La inducción por la presencia de AZC se dio principalmente a las 3 y 4 horas, pero estas crecidas no siempre coinciden, como se puede ver comparando ambos Western

blot a las 5 horas de tratamiento donde, mientras en uno los niveles caen, en el otro aumentan (Figura 8A).

Por su parte para Can, en ambos experimentos se ve un aumento de Hsp70 y Hsp90 en el primer tiempo de exposición analizado (2 horas), comparado con el control. Tal como lo obtenido con AZC, existen cambios cíclicos en los niveles de las chaperonas, aunque aquí se ve más concordancia en los puntos de caída y aumento entre ambos resultados (Figura 8B).

Finalmente, el análisis mediante Western blot nos permite sugerir que los análogos están afectando a la célula, la que responde aumentando los niveles proteicos de Hsp70 y Hsp90.

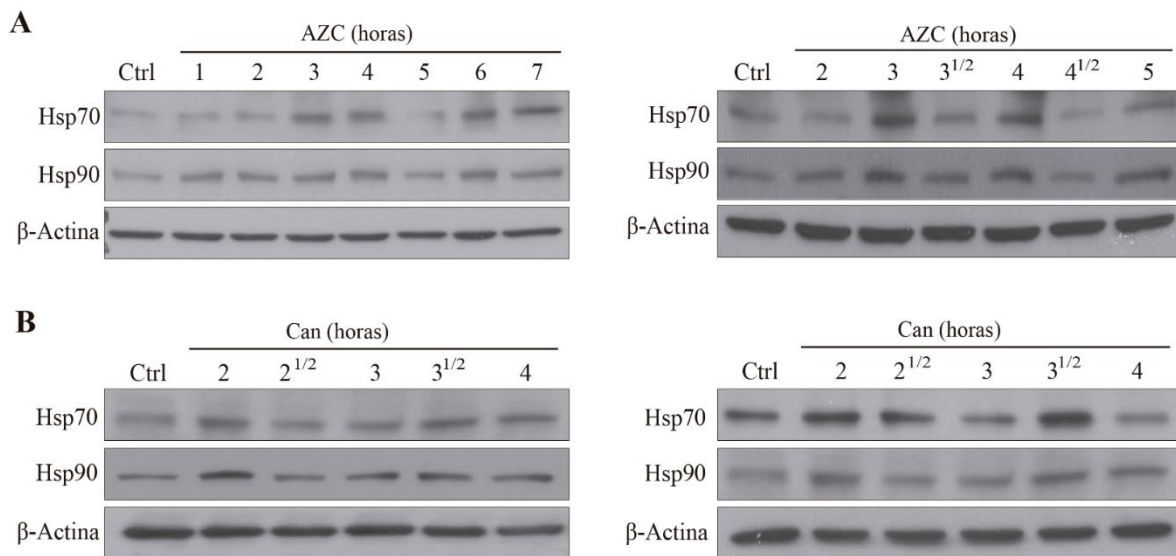


Figura 8 - Niveles proteicos de las chaperonas de estrés térmico frente a la adición de análogos aminoacídicos durante distintos tiempos. Western blot contra Hsp70 y Hsp90 de 5 μ g de extractos citosólicos obtenidos a partir de células HeLa expuestas por distintos tiempos a 5 mM de AZC (**A**) o Can (**B**). El control (Ctrl) corresponde a células no expuestas al análogo. Se usó β -actina como control de carga. Resultados de 2 cultivos independientes para cada análogo.

6.2 – Impacto de la adición de análogos en la funcionalidad de la proteína luciferasa de *Renilla*

Todas las proteínas, para llevar a cabo su función, necesitan adquirir su correcta estructura terciaria. Por lo tanto, una forma de evidenciar problemas en el plegamiento generados por la adición de análogos al medio es estudiar la disminución en la funcionalidad de una proteína que fue expuesta a estos durante su síntesis. La proteína seleccionada para dar cuenta de esta situación es la enzima luciferasa de *Renilla*, ya que la cantidad de luz emitida por esta, como subproducto de la reacción que cataliza, proporciona un parámetro cuantificable de su actividad. Células HeLa se transfectaron con el plasmidio pRL-TK, en el cual se encuentra la secuencia del gen que codifica para esta proteína (Figura 7).

Como se puede observar en la Figura 9, el homogeneizado total de las células sometidas a tratamiento con los análogos genera una emisión de luz significativamente menor a la del extracto celular sin tratar. En el caso del AZC la caída es del 80%, mientras que con Can la disminución alcanza un 63% comparada con su control respectivo. Esto nos indica que las células expuestas a cualquiera de los dos análogos presentan caídas significativas en sus niveles de emisión lumínica, probablemente debido a la síntesis de proteína luciferasa con problemas en su estructura, siendo este resultado potencialmente extrapolable al resto del proteoma celular.

6.3 – Inhibición del sistema ubiquitina-proteosoma

Debido a que el objetivo final de este trabajo es confirmar la degradación de la histona H3 mal plegada por el sistema ubiquitina-proteosoma es que se trabajó con MG132, un inhibidor reversible de la subunidad 20S de este complejo multiproteico, de acción rápida y

que, por ende, disminuye la tasa de degradación proteica asociada a este sistema [44]. Como control positivo para el inhibidor, y en base al funcionamiento ya explicado del SUP (Punto 1.3.3), se analizaron para esto dos parámetros en un extracto celular total. El primero corresponde a la acumulación de proteínas ubiquitinadas, marca característica de la mayoría de las proteínas que serán eliminadas por este sistema y, el segundo, al aumento de los niveles de una proteína de vida media corta, p53, ya que el SUP se asocia a la degradación de este tipo de proteínas [29, 30].

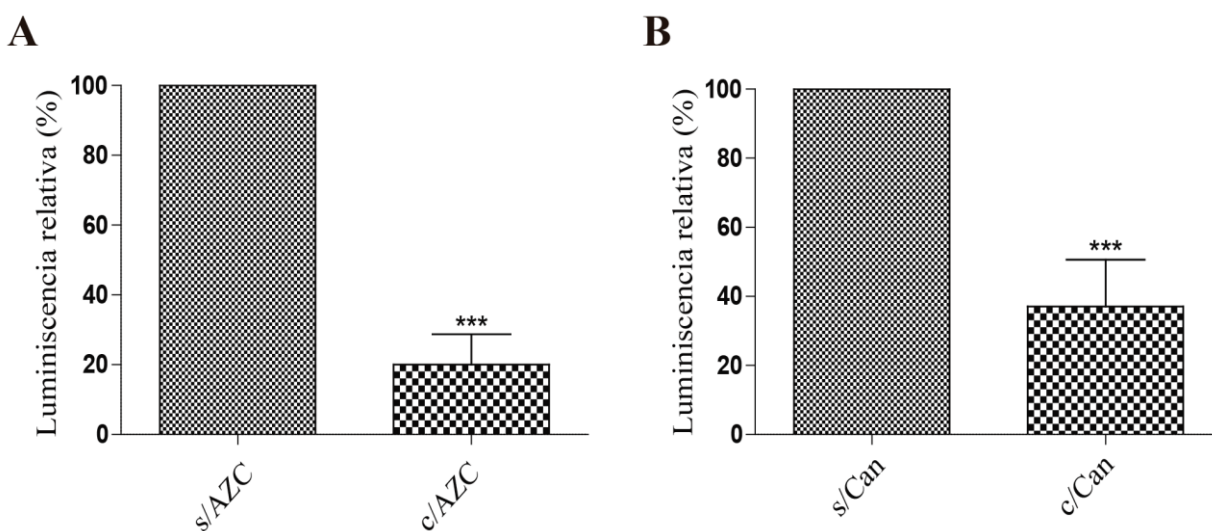


Figura 9 – Actividad luciferasa en extractos de células HeLa tratadas con análogos aminoacídicos. Emisión relativa de luminiscencia de los lisados celulares de células HeLa sin tratar (100%) versus los expuestos por 3 horas a AZC (A) o Can (B). Se consideró como valor blanco de emisión el obtenido desde células sin transfectar, lisadas y expuestas al sustrato proporcionado en el kit para la enzima. Los resultados de 7 cultivos independientes de AZC y 6 de Can, se analizaron mediante un *t* de Student, con un $p < 0,0001$ para ambos.

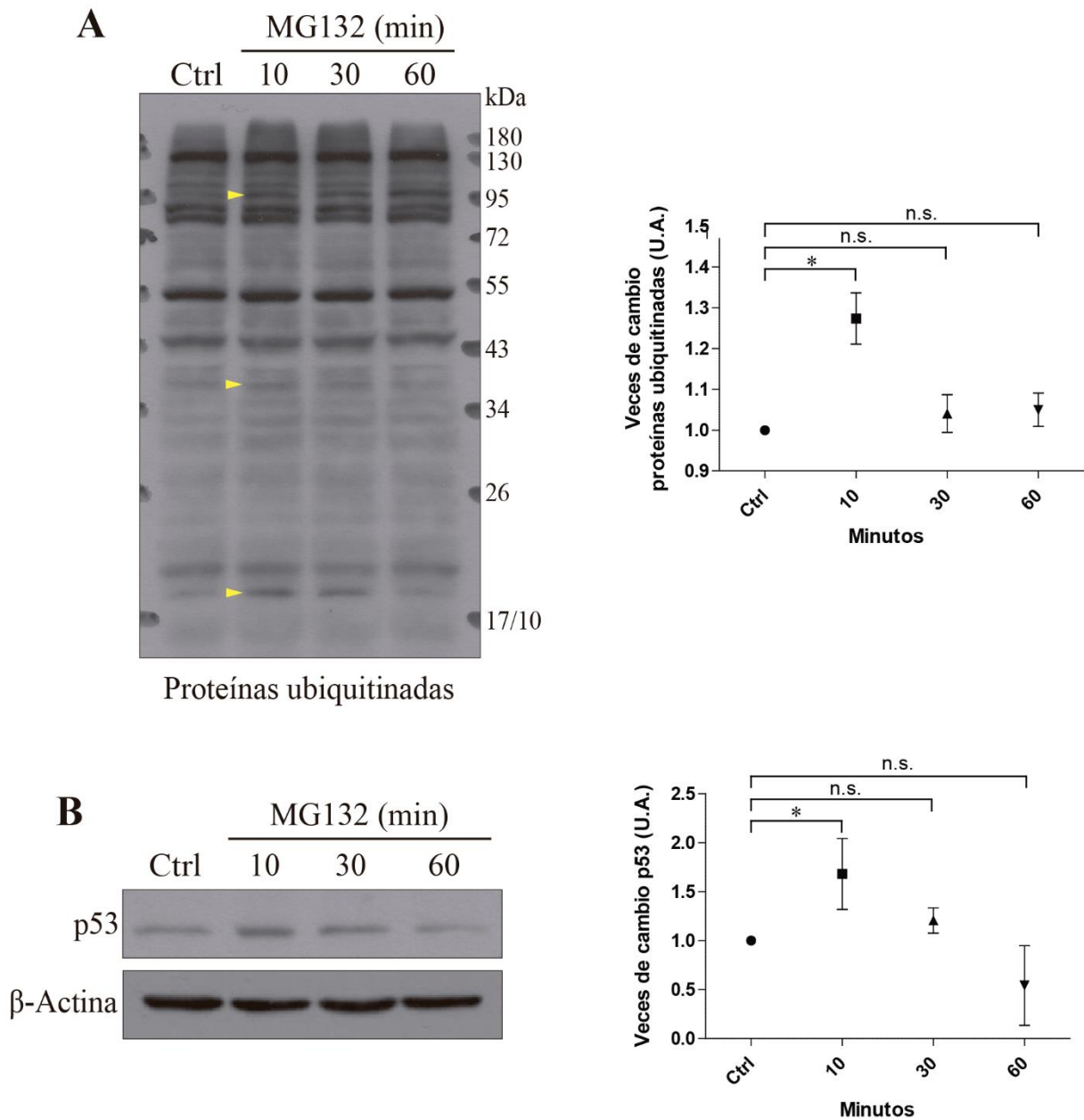


Figura 10 – Respuesta proteica a la exposición a MG132. Western blot contra proteínas ubiquitinadas (A) y p53 (B) utilizando 5 μ g de extracto celular total, luego de 10, 30 y 60 minutos de adición de MG132. En (A) se marcaron con puntas de flechas proteínas representativas de la acumulación experimental. Como se trata de un gel al 8%, no se logran separar los dos últimos estándares de peso molecular (17 y 10 kDa). A la derecha se muestra la densitometría correspondiente, de 3 experimentos independientes para cada uno. En el caso de las proteínas ubiquitinadas se cuantificó todo el carril. Normalización contra β -actina. n.s = no significativo.

Como resultado se obtuvo que las proteínas ubiquitinadas se acumulan en todos los tiempos de tratamiento con MG132, pero con una diferencia significativa solo a los 10 minutos (Figura 10A). Marcadas con puntas de flecha se señalan algunas proteínas ubiquitinadas en las cuales, comparando el control con los 10 minutos, se ve una acumulación. La densitometría asociada corresponde a todo el carril, es decir, se midieron todas las proteínas que presentasen la modificación, y a la derecha de la imagen representativa se indican los pesos moleculares del estándar de proteínas utilizado (Figura 10A).

Por su parte, p53 también experimenta una acumulación en tiempos cortos de tratamiento (10, 30 y 60 minutos), pero nuevamente la significancia se ve solo a los 10 minutos (Figura 10B), como ocurre con las proteínas ubiquitinadas (Figura 10A). A su derecha se muestra también la densitometría de 3 experimentos realizados para confirmar la acción inhibitoria de MG132 sobre el proteosoma en las células HeLa.

Los resultados obtenidos permiten concluir que 10 minutos de tratamiento con el inhibidor MG132 disminuyen, de forma efectiva, la actividad proteolítica del sistema ubiquitina-proteosoma, evidenciándose en la acumulación tanto de p53 como de proteínas ubiquitinadas.

6.4 – Cambios en los niveles proteicos de la histona H3 ante la exposición a análogos aminoacídicos

Nuestro interés se enfoca en la regulación de los niveles de la histona H3 soluble, más específicamente, la que es recientemente sintetizada y aún no es incorporada a la cromatina.

Es por esto que se procedió a estudiar qué efecto tiene sobre ellas la presencia de AZC y Can en el medio. La histona H3 posee 6 prolinas y 18 argininas en su estructura primaria (Figura 11), los aminoácidos con los que los análogos competirán por la incorporación a la proteína en síntesis.

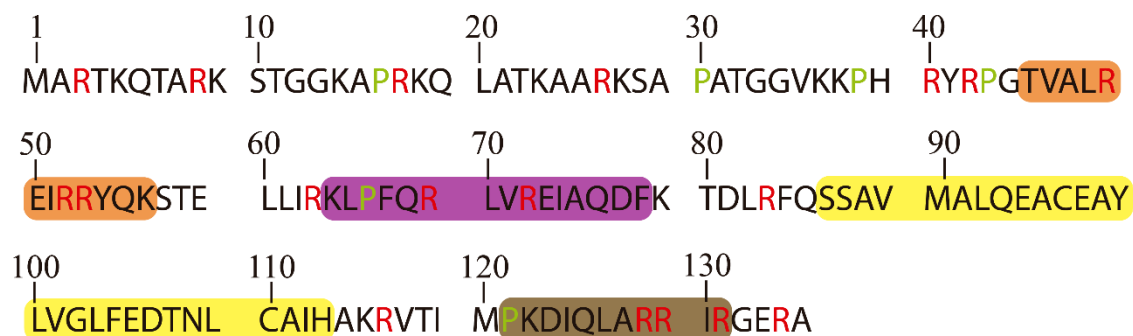


Figura 11 – Estructura primaria de la histona H3. En rojo están marcadas las argininas (R) y, en verde, las prolinas (P) presentes en la secuencia aminoacídica de la histona H3. Destacados están los aminoácidos que forman las distintas estructuras secundarias de la histona. α1: Morado. α2: Amarillo. α3: Café. αN: Naranja.

Para esto se expuso a las células HeLa a 5 mM de los análogos por distintos períodos de tiempo y se obtuvo su extracto citosólico, el que se analizó mediante Western blot, con β-actina como control de carga. Se observa que, en el citoplasma, la histona H3 responde a estos fármacos con una variación cíclica en sus niveles proteicos, como también ocurre con las chaperonas analizadas (Figura 8). Se encontraron puntos, como las 2 y 5 horas para AZC, en que la señal parece ser menor a la del control para luego volver a acumularse, por ejemplo a las 3 y 4 horas de tratamiento, para ambos casos expuestos (Figura 12A).

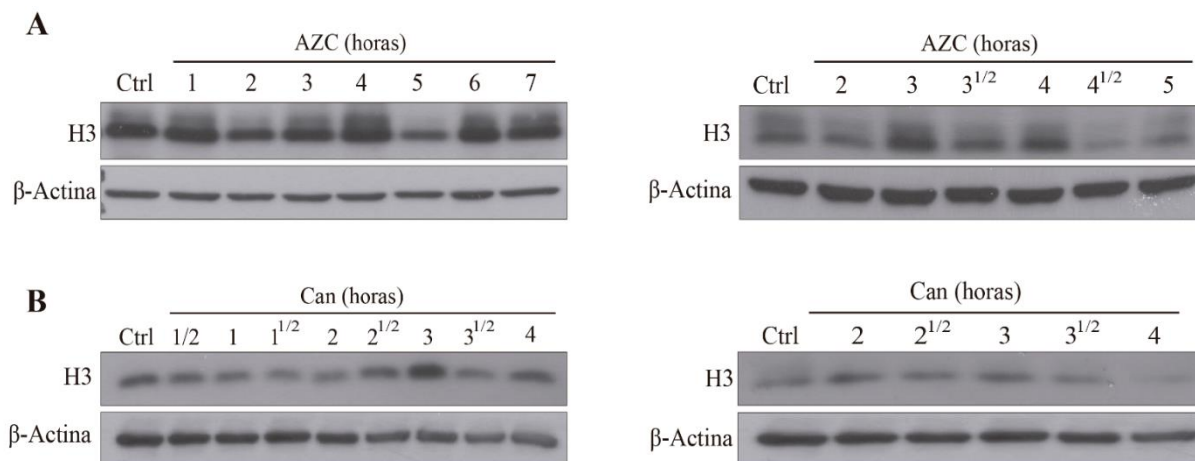


Figura 12 – Niveles proteicos de la histona H3 citosólica ante la adición de análogos aminoacídicos. Western blot contra H3 utilizando 5 μ g de los extractos citosólicos de células HeLa expuestas por distintos tiempos a AZC (**A**) o Can (**B**). El control son células expuestas a agua bidestilada estéril, con β -actina como control de carga. Se muestran dos experimentos independientes para cada análogo, tratados con el análogo correspondiente por distintos tiempos.

Si siguiendo el estudio, pero ahora con Can, se vuelven a presentar variaciones cíclicas para en los niveles proteicos de la histona H3. En ambos experimentos se ve un aumento coincidente de esta proteína a las 3 horas, pero también tiempos de tratamiento que difieren, por ejemplo un aumento de la proteína a las 2 horas en el Western blot de la derecha, que no observa en el de la izquierda, y también en el punto de las 2 horas $\frac{1}{2}$, en donde ocurre lo contrario (Figura 12B).

En base a estos resultados se sugiere que la histona H3 citosólica, frente a la incorporación de cualquiera de los dos análogos aminoacídicos al medio, experimenta una acumulación y una posterior caída, con este patrón repitiéndose de forma cíclica.

6.5 – Función del sistema ubiquitina-proteosoma en el procesamiento de la histona H3 citosólica mal plegada

Para facilitar el estudio de la condición de interés, esto es, la degradación por el proteosoma de la histona H3 citosólica mal plegada sintetizada *de novo*, se utilizaron los tiempos de tratamiento que llevan a la máxima acumulación de esta proteína. Habiendo establecido previamente las condiciones de trabajo, se procedió a exponer a las células a la inhibición del SUP y a la inducción del mal plegamiento en paralelo. Si el proteosoma está efectivamente degradando estas proteínas en particular, lo que se esperaría observar es una acumulación aún mayor de la histona cuando ambos fármacos están presentes.

En el experimento con AZC se puede apreciar que la adición de MG132 o de este análogo sobre las células genera una acumulación, no significativa, de la histona H3, a diferencia de las que fueron tratadas con ambos fármacos, donde la acumulación supera a la de los tratamientos por separado y alcanza a ser estadísticamente significativa (Figura 13A).

Para Can ocurre lo mismo que con AZC, con los niveles proteicos de la histona H3 presentando una acumulación no significativa comparada con el control cuando la célula es expuesta a MG132 o Can. Pero, cuando se juntan ambos tratamientos, la acumulación de esta proteína es nuevamente mayor que la de los procedimientos independientes, siendo significativamente diferente respecto a su control (Figura 13B).

Estos resultados muestran que, al inhibir el proteosoma hay un aumento en los niveles de la histona H3 respecto al control, la que es mucho mayor si además se induce el mal plegamiento, lo que señala la participación del sistema ubiquitina-proteosoma en la degradación de la histona H3 nativa y mal plegada.

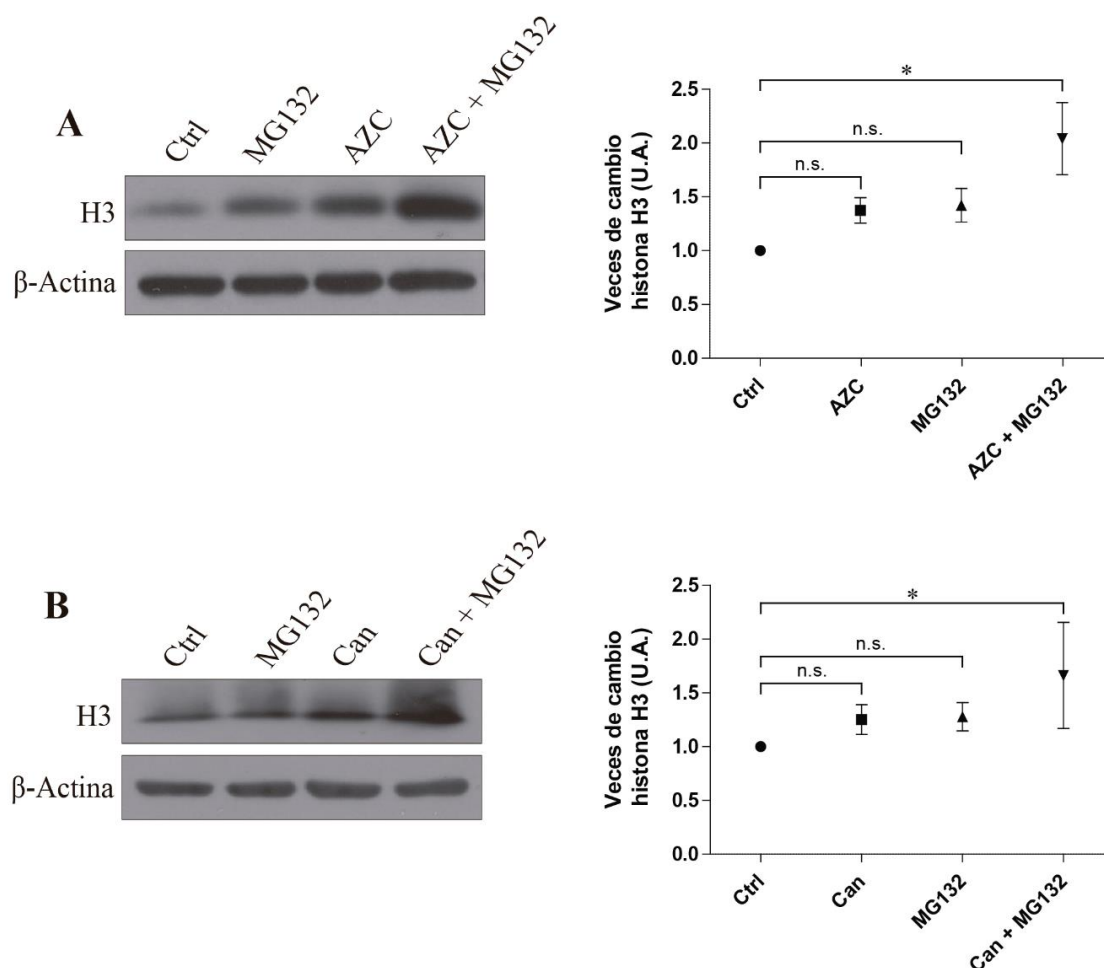


Figura 13 – Cambios en los niveles de histona H3 citosólica en respuesta al tratamiento con análogos y/o MG132. Western blot contra la histona H3 citoplasmática obtenida desde células HeLa tratadas con un análogo (3 horas para AZC y 3 horas ½ para Can), MG132 (10 minutos), o una mezcla de este último con AZC (A) o Can (B). Experimento representativo de 3 cultivos independientes para AZC y Can. Análisis mediante ANOVA de 1 vía, post-test de Dunnett, $p < 0,05$ para ambos. n.s = no significativo.

6.6 – Respuesta de los componentes de la cascada de maduración de la histona H3 citosólica ante los análogos aminoacídicos y el inhibidor del proteosoma

Las mismas muestras analizadas en la Figura 13 se usaron para estudiar, mediante Western blot, los cambios en los niveles de distintas chaperonas, enzimas y modificaciones

post-traduccionales que aparecen a lo largo de la cascada de maduración de las histonas H3 y H4 citosólicas sintetizadas *de novo*. Los resultados obtenidos permitieron clasificar las proteínas en grupos según su respuesta a las distintas mezclas de fármacos. Para AZC primero tenemos las proteínas que no cambian sus niveles sin importar el procedimiento al que se ven sometidos, que son Importina-4, Hsc70 y tNASP. En el segundo conjunto están HAT y las chaperonas Hsp90 y sNASP, para las cuales MG132 por su cuenta no genera cambios en los niveles proteicos, pero si lo hace el análogo, llevando a una acumulación respecto al control. Por su parte, los niveles de estas proteínas caen bajo el control cuando son expuestas a ambos fármacos. La clasificación final para AZC corresponde al resto de las proteínas, que responden sin un símil con el resto. Hsp70 es un ejemplo, ya que experimenta un leve aumento con AZC, y uno mucho mayor cuando este se junta con MG132. También lo son las dos isoformas de Asf1, cuyo nivel proteico experimenta una caída, en igual grado, al usar AZC o este junto al inhibidor del proteosoma (Figura 14A).

En el caso de Can el primer grupo - sin cambios - queda conformado, nuevamente, por Importina-4 ahora junto a las dos isoformas de NASP. Al siguiente grupo pertenecen HAT y la isoforma Asf1a. En todas estas MG132 no genera cambios en sus niveles proteicos, pero si lo hace Can y la mezcla de ambos fármacos resultando, en ambos casos, en un aumento similar en su cantidad. En el último grupo, la de proteínas de respuesta independiente, está la isoforma Asf1b, que solo responde al ser tratada con el análogo, con una caída en su cantidad citosólica. Con Hsc70 ocurre lo opuesto que con Asf1b ya que, aunque ambas proteínas solo responden frente al análogo, esta lo hace acumulándose, y no cayendo como la isoforma de b de Asf1. La última proteína de este grupo es Hsp70, que responde aumentando sus niveles frente a MG132 o Can, y aún más cuando ambos fármacos están presentes (Figura 14B).

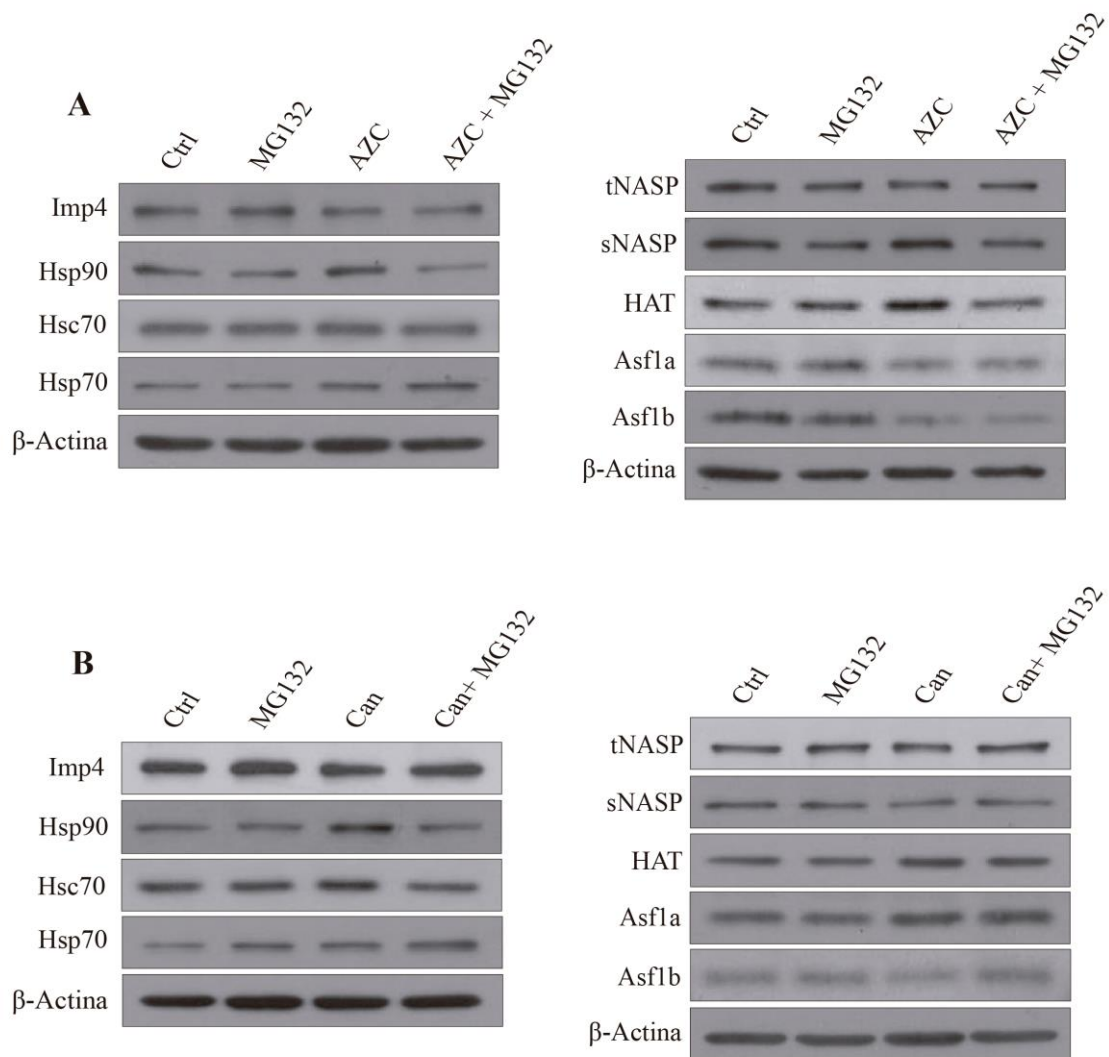


Figura 14 – Respuesta proteica de componentes de la cascada de maduración de la histonas H3 y H4 citosólicas ante distintos fármacos. Western blot de 5 µg de extractos citosólicos tratados con distintos fármacos, contra chaperonas y enzimas involucradas en la maduración de la histona H3 y H4. En (A) se usó AZC, y en (B) Can, en combinatoria con MG132 o cada uno por separado. La β-actina bajo cada conjunto de proteínas corresponde a su respectivo control de carga. Experimento representativo de 2 cultivos independientes.

Tomando en conjunto estos resultados se puede proponer, tanto para AZC como para Can, que la mayoría de las proteínas partícipes de la cascada de maduración no son

degradadas por el proteosoma, al contrario de la respuesta presentada por la histona H3 (Figuras 13).

Pasando a analizar los cambios en las modificaciones post-traduccionales de la histona H3 (K18ac y K9me1) con AZC, se observa que estas no varían respecto al control al adicionar MG132, pero caen con el análogo. Y, al usar ambos fármacos, se da una acumulación a la par de un aumento de la proteína. Por su parte H4K12ac, sin importar el tratamiento al que se expusieron las células, no presenta mayores diferencias en sus niveles (Figura 15A).

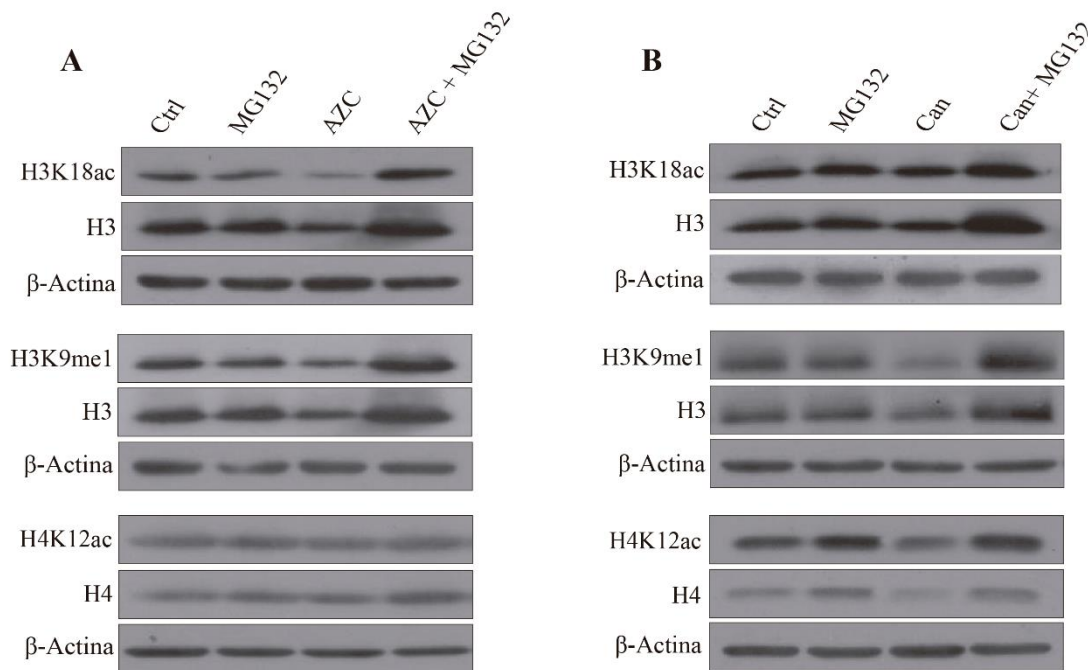


Figura 15 – Cambios en los niveles de modificaciones post-traduccionales de las histonas H3 y H4 recientemente sintetizadas frente a distintos tratamientos. Western blot de 5 μ g de extractos citosólicos tratados con distintos fármacos contra modificaciones post-traduccionales características de las histonas H3 y H4 citosólicas. En (A) se usó AZC, y en (B) Can, en combinatoria con MG132 o cada uno por separado. La β -actina bajo cada conjunto de proteínas corresponde a su respectivo control de carga. Experimento representativo de 2 cultivos independientes.

Con Can, las modificaciones de la histona H3 responden de manera diferente. En el caso de H3K18ac no se ven mayores cambios, exceptuando la acumulación generada al usar ambos fármacos, coincidente con una mayor cantidad de H3. Para H3K9me1, las variaciones se dan al usar el análogo, llevando a una caída en sus niveles, y con la mezcla de Can y MG132, generándose una acumulación de esta marca (Figura 15B). Con Can los niveles de la modificación de la histona H4 varían según el tratamiento. Se ve una acumulación similar respecto al control al usar MG132, o este junto con Can, pero si solo se adiciona el análogo esta marca cae. Todos estos cambios se correlacionan con los experimentados por H4 (Figura 15B).

Estos resultados insinúan que las histonas mal plegadas tendrían una menor cantidad de modificaciones post-traduccionales comparadas con la nativa pero, para confirmarlo, se hace necesario realizar nuevamente el experimento para ambos análogos y complementarlo con otros análisis.

7 - DISCUSIÓN

Las proteínas son las macromoléculas más diversas y abundantes en la célula, participando potencialmente de toda actividad celular. Debido a esto la célula mantiene un control férreo sobre el plegamiento, ubicación, cantidad y potenciales interacciones de cada proteína que sintetiza, lo que se conoce como proteostasis [45]. Existen una serie de actividades interconectadas encargadas de mantener este fino equilibrio, pero la mayor responsabilidad recae en la acción de chaperonas y co-chaperonas, y en la actividad de distintas maquinarias proteolíticas presentes en organismos eucariontes [46, 47].

El primer desafío para la homeostasis proteica surge con las proteínas recientemente sintetizadas, propensas a plegarse de forma incorrecta y a generar agregados proteicos, lo que se acrecienta bajo condiciones de estrés celular [35]. Esto representa un riesgo para la célula puesto que estos agregados tienen una alta citotoxicidad y se asocian con distintas patologías [48]. Las primeras en responder ante este peligro inminente son las chaperonas y co-chaperonas, que intentan revertir el plegamiento aberrante adoptado por las proteínas sintetizadas *de novo*. Si no lo logran, la degradación de las proteínas nuevas se hace ineludible y esto recae principalmente sobre el sistema ubiquitina-proteosoma [49].

La adición de análogos aminoacídicos al medio actúa como un estímulo estresante que incrementa la producción de proteínas con problemas estructurales. En esta memoria de título se trabajó con AZC y Can, que se incorporan al competir con el aminoácido nativo por el ARNt, por lo que sus efectos pueden ser revertidos al retirarlos del ambiente celular [50]. AZC es un análogo de prolina, en cuyo anillo heterocíclico se encuentran 3 en vez de 4

átomos de carbono; por su parte la arginina compite con la Can, que se diferencia de la molécula orgánica original en el reemplazo de un carbono por un oxígeno (Figura 5). Se trabajó con estos análogos debido a que ambos aminoácidos nativos se encuentran en la secuencia primaria de la histona, siendo 6 los residuos de prolina y 18 los de arginina (Figura 11).

Una primera preocupación al usar los análogos es si estos llevarán a la muerte celular, como reportó un grupo en un modelo de neuronas y astrocitos [43]. En nuestro caso, con un modelo de células HeLa no se observó un aumento importante en este parámetro, el que se obtuvo al teñir con azul de tripán las células recolectadas luego del tratamiento.

Distintas publicaciones dan cuenta del efecto inductor de la adopción de estructuras aberrantes debido a la incorporación de AZC o Can en los polipéptidos nacientes [51, 52]. En esta memoria se obtuvieron resultados concordantes con esto, usando la luciferasa de *Renilla* como proteína modelo. Se observó una disminución en la emisión lumínica desde los extractos proteicos de células transfectadas con el plasmidio que lleva la secuencia para su síntesis y que fueron tratadas con estos fármacos, lo que sugiere que se indujo una alteración en la estructura de la luciferasa (Figura 9). Sabiendo que los problemas en el plegamiento generados por la presencia de AZC y Can son globales debido a su capacidad de incorporarse a cualquier proteína que se esté sintetizando en ese momento, no sería difícil imaginar que esto se pudiese extrapolar a otros miembros del proteoma celular como lo es la histona H3.

Como el interés de esta memoria de título está centrado en la histona H3 citosólica, una posible forma de estimar si las proteínas de este tipo y sintetizadas de forma reciente presentan alteraciones en su estructura por efecto de AZC o Can podría basarse en el análisis de su capacidad de incorporarse a la cromatina, de formar dímeros con H4 y/o de interactuar con distintas chaperonas específicas para ella. Otra forma que se pensó para probar este punto

fue la realización de ensayos de termosolubilidad, basándonos en que una proteína mal plegada es más propensa a exponer dominios hidrofóbicos al medio y, por ende, a agregar. Resultados preliminares con AZC contradicen lo esperado, obteniéndose un menor grado de precipitación en las células tratadas con análogos que en el control, usándose las mismas cantidades de proteína total y exponiéndolas a las mismas temperaturas por iguales períodos de tiempo. Se sabe que, *in vivo*, las proteínas con presencia de AZC en su estructura se unen fuertemente a la chaperona Hsp70, la cual reconoce dominios hidrofóbicos expuestos, lo que podría explicar en parte los resultados obtenidos [53]. O también podría deberse a una unión de la histona H3 con Hsp90 en condiciones de inducción de mal plegamiento. Esta chaperona es de interés, tanto por su participación en la cascada de maduración, como por su alta presencia celular, pudiendo dar cuenta de entre el 1 y 2% de las proteínas celulares totales. Entre sus funciones se encuentra impedir en parte la agregación proteica al complejar y solubilizar las proteínas mal plegadas con las que interactúa, que es lo que podría estar ocurriendo en este caso [54].

Como se nombró previamente, la primera respuesta ante un aumento en los niveles de proteínas mal plegadas está dada por las chaperonas de estrés térmico y sus respectivas co-chaperonas, como es el caso de Hsp70, Hsp40 y Hsp90, entre otras [43, 55]. Estas proteínas están entre las más abundantes en los organismos eucariontes, y pueden inducirse entre 1,5 a 2 veces frente a la adición de análogos u otras condiciones estresantes [41, 56]. Es por esto que un aumento en sus niveles se usa como control positivo de la acción de los análogos lo que, como se vio en la Figura 8, ocurre efectivamente a lo largo de los distintos tiempos de exposición a cualquiera de los dos fármacos.

Se esperaba que, al ir aumentando progresivamente el tiempo de exposición de las células a los análogos esto llevara a un aumento, también progresivo, en los niveles proteicos

de las chaperonas inducibles bajo estas condiciones. Y que, si esto no ocurriese, al menos los niveles se mantuvieran relativamente constantes y mayores al control, como ocurrió en el trabajo del 2011 de Dasuri et al. [43]. Sin embargo, en nuestro caso se presentó una variación cíclica en sus niveles (Figura 8) lo que implica que el tratamiento lleva a cambios en su tasa de síntesis o degradación.

Antes de esto hay que considerar que, en los resultados presentados en esta memoria, se analizan tiempos de exposición con una diferencia máxima de 1 hora entre ellos. En el trabajo de Dasuri et al. [43] se analizaron muestras cada 3 horas, por lo que entre estos tiempos una caída podría darse sin ser notada, más aun pensando que esta es revertida, como vimos ocurre en nuestro caso. A esto hay que sumar que ellos analizaron extractos celulares totales, mientras que en nuestro laboratorio nos enfocamos en las proteínas citosólicas, por lo que no se puede descartar el aporte de chaperonas nucleares en sus resultados.

Volviendo a la idea previa, si el problema fuera en la síntesis de nuevas chaperonas la causa podría ser, como quedó registrado en el artículo de Thomas & Mathews de 1984 [41], un bloqueo de la traducción. En este vieron que la adición de cicloheximida impide la inducción de las chaperonas moleculares cuando se enfrentan a un análogo, sin que esto se deba a la degradación de sus ARN mensajeros. Pero también observaron que el mismo análogo lleva a una disminución en el proteoma total de la célula lo que, pensando en la gran cantidad de energía que requiere la traducción proteica, sería el mejor curso de acción ante condiciones adversas como lo es un aumento en las proteínas aberrantes dentro de la célula [57, 58].

La otra opción corre por cuenta de cambios en la degradación lo que no es excluyente, e incluso se cree interrelacionado, con cambios en la tasa de síntesis [59]. Esto podría explicar las variaciones tanto en las chaperonas Hsp70 y Hsp90 (Figura 8), como en la histona H3

citósica (Figura 12). Las dos principales vías de degradación en eucariontes corresponden al sistema ubiquitina-proteosoma y a la degradación lisosomal [60] y se suele asumir que cada uno de estos sistemas funciona de forma independiente, con blancos proteicos claramente determinados, sin interferir con el funcionamiento del otro. Mientras que el proteosoma elimina proteínas de vida media corta y anómalas [61], la autofagia hace lo propio con las de vida media larga, agregados proteicos y organelos dañados. Sin embargo, grupos como el Pandey en el 2007 [62] demostraron que, cuando el proteosoma presenta problemas, la respuesta lisosomal aumenta para compensar esta situación y evitar la formación de un fenotipo degenerativo. Por su parte el grupo liderado por Hao demostró que, aunque el proteosoma no es capaz de eliminar por sí mismo agregados proteicos, si es capaz de activar el proceso autofágico necesario para esto, gracias a la generación de cadenas de ubiquitina libres [63]. Un ejemplo concreto de esta interrelación es la α -sinucleína, cuya degradación no se ve limitada a uno de los sistemas como demostraron Webb y colaboradores usando inhibidores y/o activadores para ambas vías [64].

En esta memoria nos enfocamos en la participación del sistema ubiquitina-proteosoma en la degradación de la histona H3 citósica, dejando la participación de la autofagia como un blanco de investigación a futuro que, como resultados de la tesis realizada por Germán Púas muestran, no es en ningún modo descartable. Para estudiar el efecto del SUP en la degradación de la histona H3 se usó el inhibidor MG132, el que se estandarizó en sus tiempos de uso en base a la acumulación de p53, una proteína nuclear de vida media corta, y del total de proteínas ubiquitinadas, modificación presente en la mayoría de las proteínas que serán degradadas por esta vía. En base a esto, y al uso de análogos, se obtuvo el principal resultado de esta memoria, el que confirma la degradación de la histona H3 citósica por este sistema, tanto en condiciones normales como de inducción del mal

plegamiento, observándose una acumulación en sus niveles proteicos al usar el inhibidor solo (histona “normal”), o este junto a uno de los análogos (histona “defectuosa”) (Figura 13).

Se propone una exploración aún mayor de la participación del proteosoma en este contexto con el fin de asegurarse que efectivamente es la histona, y no otra proteína que la arrastre, uno de los muchos blancos de este sistema. Esto se puede explorar midiendo el nivel de ubiquitinación de esta proteína citoplasmática mal plegada comparada con la condición control, o realizando ensayos *in vitro* de la actividad proteosomal, que nos permitirá determinar de forma fehaciente la participación de este sistema. Y, si ya es clara la participación del SUP, sería interesante investigar si es el proteosoma completo (26S) o solo la subunidad catalítica (20S) la encargada de degradarla, pensando que esta última tiene la capacidad de reconocer blancos sin la necesidad de ubiquitina, solo por la presencia de dominios no estructurados en ellos, como es justamente el caso del extremo N-terminal de la histona H3 [5, 37].

Uno de los experimentos que se están realizando en nuestro laboratorio para dilucidar el grado de participación de las distintas vías proteolíticas en la degradación de la histona H3 es pretratar con cicloheximida las células para luego exponerlas a inhibidores, tanto del proteosoma como de los subtipos de autofagia, y analizar los cambios en la vida media de esta proteína. De forma tentativa, lo que ha visto es que tanto la autofagia como el proteosoma participan en la degradación. Esto se podría replicar sumando ahora la inducción del mal plegamiento, para estudiar el grado de participación del SUP cuando se trata de una histona H3 no nativa.

Para terminar, en la Figura 14 se presentan los cambios en los niveles proteicos de distintos miembros de la cascada de maduración citosólica de las histonas H3 y H4, enfrentados a los mismos fármacos utilizados a lo largo de toda esta memoria. El resumen

más global para lo obtenido en este experimento es que, contrario a lo que ocurre con las histonas H3 y H4, la mayoría de las proteínas de los complejos no experimentan una acumulación cuando se ven enfrentadas a MG132 o a uno de los análogos. Con esto se podría pensar que las histonas mal plegadas y otros miembros de su cascada de maduración son degradados, no como un complejo, sino de forma independiente, con excepción de Hsp70, lo cual ya se discutió anteriormente. Esto se podría analizar mediante ensayos de co-inmunoprecipitación para ver la capacidad de interacción de la histona mal plegada con los miembros de los complejos involucrados en su maduración, o incluso estudiar si aparecen nuevas proteínas unidas a la histona no nativa. De esta forma podemos también estudiar el nivel de distintas modificaciones post-traduccionales presentes en H3 ya que los resultados de esta memoria, mediante Western blot, sugieren una leve disminución en la presencia de alguna de ellas, lo que podría explicarse en la necesidad de que la proteína adopte cierta estructura para que las enzimas modificadoras la puedan reconocer. Relacionándolo con lo anterior la falta de modificaciones, o la aparición de nuevas, podría alterar las potenciales interacciones de la histona con otros miembros del proteoma celular.

Como último, vale la pena mencionar a tNASP, una chaperona con capacidad de actuar como reservorio para la histona H3 [22]. Lo esperado sería que, ante un aumento en el nivel de histonas, NASP respondiese de igual forma para evitar potenciales interacciones inespecíficas de esta proteína. Esto sí se observó en la tesis de Germán Púas al usar MG132 [23], pero no en nuestro caso, obteniéndose niveles similares de esta chaperona en cada condición estudiada. La principal diferencia entre ambos experimentos radica en presencia de los análogos, lo que podría sugerir que, para ser complejadas por tNASP, las histonas deben tener cierta estructura. La variación en la interacción podría estudiarse mediante una co-IP, como se nombró anteriormente, o con un ensayo de fluorimetría.

8 – CONCLUSIONES

En base a todo lo anteriormente expuesto en esta memoria de título, podemos resumir que:

- La adición del inhibidor del proteosoma MG132 genera una acumulación de los niveles proteicos de histona H3 en el citoplasma. Esto se ve exacerbado al adicionar a la par un análogo de aminoácido, sugiriendo la participación del SUP tanto en la degradación de la proteína nativa como de las que presentan problemas de plegamiento.
- El hecho de que la histona H3 responda acumulándose ante el tratamiento con MG132 y uno de los análogos, pero no lo hagan otros miembros de la cascada de maduración, sugiere que esta proteína no está arrastrando a alguno de ellos cuando es degradada por el sistema ubiquitina-proteosoma.

Para concluir, los resultados obtenidos en esta memoria reafirman la hipótesis planteada inicialmente, mostrándose la acumulación de la histona H3 mal plegada cuando el proteosoma es inhibido, demostrando su participación en la degradación de esta.

9 - BIBLIOGRAFÍA

1. Daly, M. M., Mirsky, A. E. & Ris, H. (1951) The amino acid composition and some properties of histones, *The Journal of general physiology*. **34**, 439-50.
2. Richmond, T. J. & Davey, C. A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core, *Nature*. **423**, 145-50.
3. Morales, V., Giamarchi, C., Chailleux, C., Moro, F., Marsaud, V., Le Ricousse, S. & Richard-Foy, H. (2001) Chromatin structure and dynamics: functional implications, *Biochimie*. **83**, 1029-39.
4. Tessarz, P. & Kouzarides, T. (2014) Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics, *Nature reviews Molecular cell biology*. **15**, 703-8.
5. Peterson, C. L. & Laniel, M. A. (2004) Histones and histone modifications, *Current biology : CB*. **14**, R546-51.
6. Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E. & Ren, B. (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome, *Nature genetics*. **39**, 311-8.
7. Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function, *Cell*. **128**, 693-705.
8. Young, M. D., Willson, T. A., Wakefield, M. J., Trounson, E., Hilton, D. J., Blewitt, M. E., Oshlack, A. & Majewski, I. J. (2011) ChIP-seq analysis reveals distinct H3K27me3 profiles that correlate with transcriptional activity, *Nucleic acids research*. **39**, 7415-27.
9. Campos, E. I., Fillingham, J., Li, G., Zheng, H., Voigt, P., Kuo, W. H., Seepany, H., Gao, Z., Day, L. A., Greenblatt, J. F. & Reinberg, D. (2010) The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4, *Nature structural & molecular biology*. **17**, 1343-51.
10. Alvarez, F., Munoz, F., Schilcher, P., Imhof, A., Almouzni, G. & Loyola, A. (2011) Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4, *The Journal of biological chemistry*. **286**, 17714-21.
11. Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A. & Almouzni, G. (2006) PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state, *Molecular cell*. **24**, 309-16.

12. Rivera, C., Saavedra, F., Alvarez, F., Diaz-Celis, C., Ugalde, V., Li, J., Forne, I., Gurard-Levin, Z. A., Almouzni, G., Imhof, A. & Loyola, A. (2015) Methylation of histone H3 lysine 9 occurs during translation, *Nucleic acids research*. **43**, 9097-106.
13. Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Pemberton, L. F. (2002) Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast, *The Journal of biological chemistry*. **277**, 862-8.
14. Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J. P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S. Y. & Almouzni, G. (2009) The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin, *EMBO reports*. **10**, 769-75.
15. Han, M., Chang, M., Kim, U. J. & Grunstein, M. (1987) Histone H2B repression causes cell-cycle-specific arrest in yeast: effects on chromosomal segregation, replication, and transcription, *Cell*. **48**, 589-97.
16. Gunjan, A. & Verreault, A. (2003) A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*, *Cell*. **115**, 537-49.
17. Burgess, R. J. & Zhang, Z. (2013) Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease, *Nature structural & molecular biology*. **20**, 14-22.
18. Loyola, A. & Almouzni, G. (2004) Histone chaperones, a supporting role in the limelight, *Biochimica et biophysica acta*. **1677**, 3-11.
19. Gurard-Levin, Z. A., Quivy, J. P. & Almouzni, G. (2014) Histone chaperones: assisting histone traffic and nucleosome dynamics, *Annual review of biochemistry*. **83**, 487-517.
20. Cuervo, A. M. (2010) Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. **21**, 142-50.
21. Patel, B. & Cuervo, A. M. (2015) Methods to study chaperone-mediated autophagy, *Methods*. **75**, 133-40.
22. Cook, A. J., Gurard-Levin, Z. A., Vassias, I. & Almouzni, G. (2011) A specific function for the histone chaperone NASP to fine-tune a reservoir of soluble H3-H4 in the histone supply chain, *Molecular cell*. **44**, 918-27.
23. Púas, G. (2014) Análisis de la dinámica de los complejos citosólicos de las histonas H3 y H4 al inhibir la degradación proteica. Tesis de grado para optar al título profesional de Biotecnólogo, Santiago, Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología. Realizada en Fundación Ciencia & Vida.

24. Amm, I., Sommer, T. & Wolf, D. H. (2014) Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system, *Biochimica et biophysica acta*. **1843**, 182-96.
25. Esser, C., Alberti, S. & Hohfeld, J. (2004) Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system, *Biochimica et biophysica acta*. **1695**, 171-88.
26. Adams, J. (2003) The proteasome: structure, function, and role in the cell, *Cancer treatment reviews*. **29 Suppl 1**, 3-9.
27. Tomko, R. J., Jr. & Hochstrasser, M. (2013) Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome, *Annual review of biochemistry*. **82**, 415-45.
28. Walsh, R. C., Alloway, R. R., Girnita, A. L. & Woodle, E. S. (2012) Proteasome inhibitor-based therapy for antibody-mediated rejection, *Kidney international*. **81**, 1067-74.
29. Fuertes, G., Villarroya, A. & Knecht, E. (2003) Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions, *The international journal of biochemistry & cell biology*. **35**, 651-64.
30. Maltzman, W. & Czyzyk, L. (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells, *Molecular and cellular biology*. **4**, 1689-94.
31. Kanie, T., Onoyama, I., Matsumoto, A., Yamada, M., Nakatsumi, H., Tateishi, Y., Yamamura, S., Tsunematsu, R., Matsumoto, M. & Nakayama, K. I. (2012) Genetic reevaluation of the role of F-box proteins in cyclin D1 degradation, *Molecular and cellular biology*. **32**, 590-605.
32. Gregory, M. A. & Hann, S. R. (2000) c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells, *Molecular and cellular biology*. **20**, 2423-35.
33. Commerford, S. L., Carsten, A. L. & Cronkite, E. P. (1982) Histone turnover within nonproliferating cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **79**, 1163-5.
34. Singh, R. K., Kabbaj, M. H., Paik, J. & Gunjan, A. (2009) Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis, *Nature cell biology*. **11**, 925-33.
35. Ellis, R. J. (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, *Trends in biochemical sciences*. **26**, 597-604.

36. Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature*. **404**, 770-4.
37. Eralles, J. & Coffino, P. (2014) Ubiquitin-independent proteasomal degradation, *Biochimica et biophysica acta*. **1843**, 216-21.
38. Qian, M. X., Pang, Y., Liu, C. H., Haratake, K., Du, B. Y., Ji, D. Y., Wang, G. F., Zhu, Q. Q., Song, W., Yu, Y., Zhang, X. X., Huang, H. T., Miao, S., Chen, L. B., Zhang, Z. H., Liang, Y. N., Liu, S., Cha, H., Yang, D., Zhai, Y., Komatsu, T., Tsuruta, F., Li, H., Cao, C., Li, W., Li, G. H., Cheng, Y., Chiba, T., Wang, L., Goldberg, A. L., Shen, Y. & Qiu, X. B. (2013) Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis, *Cell*. **153**, 1012-24.
39. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei, *Nucleic acids research*. **11**, 1475-89.
40. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*. **72**, 248-54.
41. Thomas, G. P. & Mathews, M. B. (1984) Alterations of transcription and translation in HeLa cells exposed to amino acid analogs, *Molecular and cellular biology*. **4**, 1063-72.
42. Hightower, L. E. (1980) Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides, *Journal of cellular physiology*. **102**, 407-27.
43. Dasuri, K., Ebenezer, P. J., Uranga, R. M., Gavilan, E., Zhang, L., Fernandez-Kim, S. O., Bruce-Keller, A. J. & Keller, J. N. (2011) Amino acid analog toxicity in primary rat neuronal and astrocyte cultures: implications for protein misfolding and TDP-43 regulation, *Journal of neuroscience research*. **89**, 1471-7.
44. Kisselev, A. F. & Goldberg, A. L. (2001) Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates, *Chemistry & biology*. **8**, 739-58.
45. Labbadia, J. & Morimoto, R. I. (2015) The biology of proteostasis in aging and disease, *Annual review of biochemistry*. **84**, 435-64.
46. Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M. & Hartl, F. U. (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis, *Annual review of biochemistry*. **82**, 323-55.

47. Lilienbaum, A. (2013) Relationship between the proteasomal system and autophagy, *International journal of biochemistry and molecular biology*. **4**, 1-26.
48. Aguzzi, A. & O'Connor, T. (2010) Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives, *Nature reviews Drug discovery*. **9**, 237-48.
49. Eisele, F. & Wolf, D. H. (2008) Degradation of misfolded protein in the cytoplasm is mediated by the ubiquitin ligase Ubr1, *FEBS letters*. **582**, 4143-6.
50. Fowden, L. & Richmond, M. H. (1963) Replacement of proline by azetidine-2-carboxylic acid during biosynthesis of protein, *Biochimica et biophysica acta*. **71**, 459-461.
51. Bessonov, K., Bamm, V. V. & Harauz, G. (2010) Misincorporation of the proline homologue Aze (azetidine-2-carboxylic acid) into recombinant myelin basic protein, *Phytochemistry*. **71**, 502-7.
52. Rosenthal, G. A., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1989) L-canavanine incorporation into vitellogenin and macromolecular conformation, *The Journal of biological chemistry*. **264**, 13693-6.
53. Beckmann, R. P., Mizzen, L. E. & Welch, W. J. (1990) Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly, *Science*. **248**, 850-4.
54. Whitesell, L. & Lindquist, S. L. (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer, *Nature reviews Cancer*. **5**, 761-72.
55. Li, G. C. & Laszlo, A. (1985) Amino acid analogs while inducing heat shock proteins sensitize CHO cells to thermal damage, *Journal of cellular physiology*. **122**, 91-7.
56. Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J. & Lindquist, S. (1989) hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures, *Molecular and cellular biology*. **9**, 3919-30.
57. Liu, B., Han, Y. & Qian, S. B. (2013) Cotranslational response to proteotoxic stress by elongation pausing of ribosomes, *Molecular cell*. **49**, 453-63.
58. Holcik, M. & Sonenberg, N. (2005) Translational control in stress and apoptosis, *Nature reviews Molecular cell biology*. **6**, 318-27.
59. Ding, Q., Cecarini, V. & Keller, J. N. (2007) Interplay between protein synthesis and degradation in the CNS: physiological and pathological implications, *Trends in neurosciences*. **30**, 31-6.

60. Ciechanover, A. (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome, *Nature reviews Molecular cell biology*. **6**, 79-87.
61. Seufert, W. & Jentsch, S. (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins, *The EMBO journal*. **9**, 543-50.
62. Pandey, U. B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B. A., Ritson, G. P., Nedelsky, N. B., Schwartz, S. L., DiProspero, N. A., Knight, M. A., Schuldiner, O., Padmanabhan, R., Hild, M., Berry, D. L., Garza, D., Hubbert, C. C., Yao, T. P., Baehrecke, E. H. & Taylor, J. P. (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS, *Nature*. **447**, 859-63.
63. Hao, R., Nanduri, P., Rao, Y., Panichelli, R. S., Ito, A., Yoshida, M. & Yao, T. P. (2013) Proteasomes activate aggresome disassembly and clearance by producing unanchored ubiquitin chains, *Molecular cell*. **51**, 819-28.
64. Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N. & Rubinsztein, D. C. (2003) Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome, *The Journal of biological chemistry*. **278**, 25009-13.